

Université de Montréal

**Devenir environnemental des antidépresseurs dans les  
rejets urbains par chromatographie liquide à haute  
performance couplée à la spectrométrie de masse en  
tandem**

par

André Lajeunesse

Département de chimie

Art et Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor*

en Chimie

option Analytique

21 juin 2012

© André Lajeunesse, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Devenir environnemental des antidépresseurs dans les rejets urbains par chromatographie  
liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Présentée par :  
André Lajeunesse

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Kevin Wilkinson, président-rapporteur  
Sébastien Sauvé, directeur de recherche  
Christian Gagnon, co-directeur  
Karen Waldron, membre du jury  
Jocelyne Hellou, examinateur externe  
Richard Carignan, représentant du doyen de la FAS

## Résumé

---

Les troubles reliés à la dépression, l'épuisement professionnel et l'anxiété sont de plus en plus répandus dans notre société moderne. La consommation croissante d'antidépresseurs dans les différents pays du monde est responsable de la récente détection de résidus à l'état de traces dans les rejets urbains municipaux. Ainsi, ces substances dites « *émergentes* » qui possèdent une activité pharmacologique destinée à la régulation de certains neurotransmetteurs dans le cerveau suscitent maintenant de nombreuses inquiétudes de la part de la communauté scientifique.

L'objectif principal de ce projet de doctorat a été de mieux comprendre le devenir de plusieurs classes d'antidépresseurs présents dans diverses matrices environnementales (i.e. eaux de surfaces, eaux usées, boues de traitement, tissus biologiques) en développant de nouvelles méthodes analytiques fiables capables de les détecter, quantifier et confirmer par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-QqQMS, LC-QqToFMS).

Une première étude complétée à la station d'épuration de la ville de Montréal a permis de confirmer la présence de six antidépresseurs et quatre métabolites *N*-desmethyl dans les affluents (2 - 330 ng L<sup>-1</sup>). Pour ce traitement primaire (physico-chimique), de faibles taux d'enlèvement ( $\leq 15\%$ ) ont été obtenus. Des concentrations d'antidépresseurs atteignant près de 100 ng L<sup>-1</sup> ont également été détectées dans le fleuve St-Laurent à 0.5 km du point de rejet de la station d'épuration.

Une seconde étude menée à la même station a permis l'extraction sélective d'antidépresseurs dans trois tissus (i.e. foie, cerveau et filet) de truites mouchetées juvéniles

exposées à différentes concentrations d'effluent dilué traité et non-traité à l'ozone. Un certain potentiel de bioaccumulation dans les tissus ( $0.08\text{--}10\text{ ng g}^{-1}$ ) a été observé pour les spécimens exposés à l'effluent non-traité (20% v/v) avec distribution majoritaire dans le foie et le cerveau. Une intéressante corrélation a été établie entre les concentrations de trois antidépresseurs dans le cerveau et l'activité d'un biomarqueur d'exposition (i.e. pompe N/K ATPase impliquée dans la régulation de la sérotonine) mesurée à partir de synaptosomes de truites exposées aux effluents.

Une investigation de l'efficacité de plusieurs stations d'épuration canadiennes opérant différents types de traitements a permis de constater que les traitements secondaires (biologiques) étaient plus performants que ceux primaires (physico-chimiques) pour enlever les antidépresseurs (taux moyen d'enlèvement : 30%). Les teneurs les plus élevées dans les boues traitées (biosolides) ont été obtenues avec le citalopram ( $1033\text{ ng g}^{-1}$ ), la venlafaxine ( $833\text{ ng g}^{-1}$ ) et l'amitriptyline ( $78\text{ ng g}^{-1}$ ). Des coefficients de sorption expérimentaux ( $K_d$ ) calculés pour chacun des antidépresseurs ont permis d'estimer une grande sorption des composés sertraline, desméthylsertraline, paroxetine et fluoxetine sur les solides ( $\log K_d > 4$ ). Finalement, un excellent taux d'enlèvement moyen de 88% a été obtenu après ozonation ( $5\text{ mg L}^{-1}$ ) d'un effluent primaire. Toutefois, la caractérisation de nouveaux sous-produits *N*-oxyde (venlafaxine, desméthylvenlafaxine) par spectrométrie de masse à haute résolution (LC-QqToFMS) dans l'effluent traité à l'ozone a mis en lumière la possibilité de formation de multiples composés polaires de toxicité inconnue.

**Mots-clés :** Antidépresseurs, métabolites, sous-produits, pharmaceutiques, eaux usées, boues traitées, stations d'épuration, ozone, chromatographie liquide, spectrométrie de masse en tandem.

## Abstract

---

Mood disorders such as depression, burn-out and anxiety have increased in our modern society. Increasing amounts of antidepressant prescriptions around the world are now suspected to be the main cause of the recent detection of traces of antidepressant residues within urban wastewaters. These so-called “emerging” substances that possess pharmacological activity towards neurotransmitter regulation in the brain have raised serious concerns from the scientific community.

The initial goal of the study was to better understand the fate of various classes of antidepressants present in different environmental matrices (e.g. surface waters, wastewaters, treatment sludge, and biological tissues) by developing novel reliable analytical methods that can detect, quantify and confirm antidepressants using high performance liquid chromatography coupled to tandem-mass spectrometry (LC-QqQMS, LC-QqToFMS).

A preliminary study completed at the Montreal sewage treatment plant (STP) confirmed the presence of six antidepressants and four *N*-desmethyl metabolites in raw sewage (2 – 330 ng L<sup>-1</sup>). For this primary treatment (physico-chemical), low removal rates ( $\leq 15\%$ ) were obtained. Concentrations of antidepressant close to 100 ng L<sup>-1</sup> were also detected directly in the St. Lawrence River at 0.5 km of the effluent outfall.

A second study conducted at the same STP allowed the selective extraction of antidepressants in three biological tissues (e.g. liver, brain, and filet) dissected from juvenile brook trouts previously exposed to diluted untreated and treated effluents with ozone. Bioaccumulation of antidepressants was readily observed in fish tissues (0.08-10 ng

$\text{g}^{-1}$ ) for the specimens exposed to untreated effluent (20% v/v), with major distribution in liver and brain. During experiments, a significant correlation was established between the concentrations of three antidepressants detected in brain tissues and the activity of a selected biomarker of exposition (e.g. an N/K ATPase pump involved in the serotonin regulation) measured within dissected synaptosomes from trout exposed to effluents.

Investigation of estimated treatment removal efficiencies from various Canadian STPs operating different disinfection modes showed that secondary treatments (biological) were more efficient than primary (physico-chemical) to remove antidepressants (mean removal rates : 30%). The highest amounts detected in treated sludge (biosolids) were obtained respectively with citalopram ( $1033 \text{ ng g}^{-1}$ ), venlafaxine ( $833 \text{ ng g}^{-1}$ ), and amitriptyline ( $78 \text{ ng g}^{-1}$ ). Experimental calculated sorption coefficients ( $K_d$ ) of each antidepressant predicted fairly good sorption capacities for sertraline, desmethylsertraline, paroxetine, and fluoxetine to solid matters ( $\log K_d > 4$ ). Finally, an excellent mean removal rate of 88% was obtained after ozonation ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) of a primary effluent. However, the characterization of new *N*-oxide side-products (venlafaxine, desmethylvenlafaxine) in ozonized effluent by high-resolution mass spectrometry (LC-QqToFMS) highlighted the possibility of formation of multiple polar compounds with unknown toxicity.

**Keywords:** Antidepressants, metabolites, side-products, pharmaceuticals, wastewater, treated sludge, sewage treatment plants, ozone, liquid chromatography, tandem-mass spectrometry.

# Table des matières

---

<b>Résumé.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Liste d'abréviations, sigles et acronymes.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Chapitre 1: Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
1.1. La dépression.....	2
1.1.1. Définition de la dépression clinique.....	2
1.1.2. Statistiques sur la dépression au Québec et au Canada.....	3
1.1.3. Mécanismes biochimiques de la dépression.....	5
1.1.3.a. Les hormones glucocorticoïdes.....	5
1.1.3.b. Les neurotransmetteurs et récepteurs associés.....	6
1.2. Les antidépresseurs.....	9
1.2.1. Classification.....	9
1.2.1.a. Inhibiteurs de monoamine oxydase (MAOIs).....	10
1.2.1.b. Tricycliques (TC).....	11
1.2.1.c. Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRIs).....	13
1.2.1.d. Inhibiteur mixtes (double action) et autres antidépresseurs.....	15
1.3. Les antidépresseurs dans l'environnement.....	16
1.3.1. Source et transport.....	16
1.4. Devenir des antidépresseurs.....	19
1.4.1. Devenir dans les stations d'épuration.....	19
1.4.1.a. La dilution.....	19
1.4.1.b. La sorption.....	20

1.4.1.c. La dégradation ou persistance.....	21
1.4.2. Devenir environnemental.....	23
1.4.2.a. Milieux aquatiques.....	23
1.4.2.b. Bioaccumulation chez les organismes aquatiques.....	24
1.5. Effets des antidépresseurs sur certains organismes aquatiques.....	25
1.6. Préparation des échantillons environnementaux.....	29
1.6.1. Eaux usées (affluents, effluents).....	29
1.6.2. Boues de traitement.....	29
1.6.3. Tissus biologiques.....	30
1.7. Instrumentation.....	30
1.7.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	31
1.7.2. Spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS.....	32
1.7.3. Couplage chromatographie - spectrométrie de masse.....	33
1.7.4. Techniques d'analyse par triple quadripôle (QqQMS).....	34
1.7.5. Analyseur temps de vol (QqToF).....	36
1.8. Méthodes d'analyse des antidépresseurs.....	38
1.8.1. Premières méthodes, études médicales et médico-légales.....	38
1.8.2. Méthodes environnementales.....	39
1.9. Perspective de la recherche.....	45
1.10. Structure de la thèse.....	47

## **Chapitre 2 : Détermination d'antidépresseurs basiques et leurs métabolites**

### ***N*-desméthyle dans les eaux brutes d'égouts et les eaux usées en utilisant**

### **l'extraction sur phase solide et la chromatographie liquide couplée**

### **à la spectrométrie de masse en tandem.....49**

Abstract.....	50
2.1. Introduction.....	51
2.2. Experimental section.....	56
2.2.1. Chemicals and standards.....	56
2.2.2. Tandem mass spectrometry.....	56



2.2.3. Liquid chromatography.....	57
2.2.4. Sample collection.....	59
2.2.5. Sample extraction.....	59
2.2.6. Method validation.....	60
2.2.7. Data analysis.....	61
2.3. Results and discussion.....	62
2.3.1. LC-MS/MS method.....	62
2.3.2. Chromatographic separation.....	64
2.3.3. Solid-phase extraction (SPE) and matrix effects.....	67
2.3.4. Stability of spiked effluent samples.....	69
2.3.5. Application to environmental analysis.....	71
2.4. Conclusion.....	74
2.5. Acknowledgements.....	74

**Chapitre 3 : Distribution d'antidépresseurs et leurs métabolites à l'intérieur  
de truites mouchetées exposées à des eaux usées municipales avant et après  
traitement à l'ozone - Preuve d'effets biologiques.....75**

Abstract.....	76
3.1. Introduction.....	77
3.2. Experimental.....	79
3.2.1. Chemicals and standards.....	79
3.2.2. Experimental procedures.....	80
3.2.2.a. Instrumental parameters.....	80
3.2.2.b. Fish collection and preparation.....	81
3.2.2.c. Sample extraction.....	81
3.2.2.d. Na/K-ATPase activity determinations.....	82
3.3. Results and discussion.....	83
3.3.1. Chemical analysis.....	83
3.3.1.a. LC-MS/MS method validation.....	83
3.3.1.b. Application to fish analysis.....	84

3.3.2. Na/K-ATPase activity.....	91
3.4. Conclusion.....	95
3.5. Acknowledgements.....	96
Supplementary material.....	97
3.6. Total serotonin level determination by competitive immunoassay.....	101
<b>Chapitre 4 : Distribution de résidus d’antidépresseurs dans les eaux usées et les boues de traitement suivant l’application de différents procédés de désinfection par des stations d’épuration au Canada.....</b>	<b>102</b>
Abstract.....	103
4.1. Introduction.....	104
4.2. Experimental.....	106
4.2.1. Chemicals and materials.....	106
4.2.2. Instrumentation.....	107
4.2.3. Samples collection and preparation.....	108
4.2.4. Sample extraction.....	109
4.2.4.a. Aqueous sewage samples.....	109
4.2.4.b. Treated biosolids samples.....	111
4.2.5. Methods validation.....	112
4.2.5.a. Aqueous sewage samples.....	112
4.2.5.b. Treated biosolids samples.....	113
4.3. Results and discussion.....	113
4.3.1. Validation tests.....	113
4.3.1.a. Aqueous sewage samples.....	113
4.3.1.b. Treated biosolids samples.....	116
4.3.2. Antidepressants in wastewater.....	117
4.3.3. Antidepressants in treated biosolids.....	124
4.4. Conclusion.....	128
4.5. Acknowledgements.....	128
Supplementary material.....	129

## **Chapitre 5 : Oxydation d'antidépresseurs par ozone – Évaluation du traitement et caractérisation de nouveaux sous-produits par spectrométrie de masse**

### **à haute résolution (LCqToFMS).....132**

Abstract.....	133
5.1. Introduction.....	134
5.2. Material and methods.....	136
5.2.1. Chemicals and materials.....	136
5.2.2. Instrumentation.....	139
5.2.2.a. Liquid chromatography (LC).....	139
5.2.2.b. Tandem-mass spectrometry (QqQMS, QToFMS).....	139
5.2.3. Sample location and collection.....	140
5.2.3.a. Sample location.....	140
5.2.3.b. Sample collection.....	141
5.2.4. Sample extraction.....	142
5.2.4.a. Sewage samples.....	142
5.2.4.b. Sewage sludge samples.....	143
5.3. Results and discussion.....	143
5.3.1. Antidepressants in raw sewage and primary-treated effluent.....	143
5.3.2. Antidepressants in sewage sludge.....	145
5.3.3. Antidepressants in treated effluent - Ozonation.....	147
5.3.4. Characterization of new by-products by LC-QToFMS.....	150
5.4. Conclusion.....	154
5.5. Acknowledgements.....	154
Supplementary material.....	155

### **Chapitre 6 : Conclusion.....157**

6.1. Contributions scientifiques.....	158
6.2. Défis, perspectives d'avenir.....	161

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1-1.</b> Données de toxicité aiguë et chronique sélectionnées dans la littérature impliquant une exposition aux antidépresseurs SSRIs.....	28
<b>Tableau 1-2.</b> Méthodes analytiques optimisées impliquant la détermination d'antidépresseurs dans divers échantillons environnementaux.....	42
<b>Tableau 2-1.</b> Physicochemical properties and molecular structures of target antidepressants and their metabolites.....	54
<b>Tableau 2-2.</b> Optimized LC-(ESI+)-MS/MS conditions for the analysis of antidepressants and their metabolites.....	58
<b>Tableau 2-3.</b> Recoveries and estimated limits of detection (LOD) of selected antidepressants and some of their metabolites in spiking experiments with 500 mL of various aqueous matrices (nominal concentration 500 ng L <sup>-1</sup> ).....	68
<b>Tableau 2-4.</b> Percent recovered of selected antidepressants and some of their Metabolites in spiked sewage effluent after seven days of storage at 4°C.....	71
<b>Tableau 2-5.</b> Mean concentrations (ng L <sup>-1</sup> ) of antidepressants and metabolites retrieved in Montreal WTP samples and at a site 0.5 km of the effluent outfall in the receiving waters of the St. Lawrence River.....	73
<b>Tableau 3-1.</b> Mean concentrations ( $\pm$ Standard deviation) of antidepressants in 20% v/v effluent mesocosm and estimated bioconcentration factor of antidepressants in brook trout.....	87

<b>Tableau 3-2.</b> Concentrations of antidepressants retrieved in 100 mg of liver, brain, filet tissue extracts from brook trout exposed in mesocosms to diluted effluents at the Montreal WWTP.....	88
<b>Tableau 3-3.</b> Optimized mass spectrometer parameters of antidepressants.....	98
<b>Tableau 3-4.</b> Estimated limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of antidepressants for fish extracts.....	99
<b>Tableau 4-1.</b> Main characteristics of the studied sewage treatment plants.....	110
<b>Tableau 4-2.</b> Validation tests results for final effluent, raw influent, and treated biosolids: recoveries, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), and instrumental precision of the method.....	115
<b>Tableau 4-3.</b> Mean (n=6) concentrations of the antidepressants and metabolites detected in different Canadian STPs along with corresponding removal efficiency (eff. %). ....	121
<b>Tableau 4-4.</b> Mean (n=4) concentrations of the antidepressants and metabolites in treated biosolids detected in different Canadian STPs along with corresponding experimental calculated sorption coefficient - $K_d$ .....	127
<b>Tableau 4-5.</b> Optimized LC-(ESI+) QqQ conditions for the analysis of antidepressants.....	130
<b>Tableau 5-1.</b> Main water characteristics of the Repentigny sewage treatment plant.....	141

<b>Tableau 5-2.</b> Mean concentrations of studied compounds extracted in the wastewater (raw sewage, effluent) and biosolid samples from the Repentigny STP.....	144
<b>Tableau 5-3.</b> Mean concentrations and removal of antidepressants contained in final effluent following ozonation.....	149
<b>Tableau 5-4.</b> Optimized LC-(ESI+) QqQ conditions for the analysis of antidepressants.....	156

## Liste des figures

---

<b>Figure 1-1.</b> Schéma d'une synapse humain et ses principales composantes.....	6
<b>Figure 1-2.</b> Schéma des principales étapes de synthèse et du métabolisme des neurotransmetteurs impliqués dans le mécanisme de la dépression.....	7
<b>Figure 1-3.</b> Structures chimiques de quelques antidépresseurs de la classe des MAOIs avec action a) irréversible, b) réversible.....	11
<b>Figure 1-4.</b> Principales familles d'antidépresseurs TC avec amines a) tertiaires, b) secondaires.....	12
<b>Figure 1-5.</b> Structures chimiques de quelques antidépresseurs de la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRIs).....	14
<b>Figure 1-6.</b> Structures chimiques de quelques antidépresseurs de la classe des inhibiteurs mixtes (double action) et autres antidépresseur.....	15
<b>Figure 1-7.</b> Routes anticipées des antidépresseurs dans l'environnement.....	18
<b>Figure 1-8.</b> Schéma des principales parties d'un analyseur QqQMS.....	35
<b>Figure 1-9.</b> Schéma des principales parties d'un analyseur QqToFMS.....	37
<b>Figure 2-1.</b> Daily consumption of antipsychotic and antidepressant drugs in the Province of Quebec, Canada (number of pills bought in retail drug stores per thousand people).....	52

<b>Figure 2-2.</b> LC-(+ESI)-MS/MS signal intensity of two mobile phases tested for the determination of selected TC antidepressants, SSRIs and metabolites.....	63
<b>Figure 2-3.</b> Chromatographic resolution of sertraline and its metabolite <i>N</i> -desmethylsertraline using two mobile phases of different pH and composition: (a) NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO 10 mM pH 4.0, (b) NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 10 mM pH 7.8.....	65
<b>Figure 2-4.</b> Time-scheduled SRM chromatograms of TC antidepressants, SSRIs and some of their metabolites in the receiving waters of the St. Lawrence River 0.5 km from the effluent outfall: (1) Desmethylenlafaxine, (2) Tramadol <sup>13</sup> - <i>d</i> <sub>3</sub> , (3) Venlafaxine, (4) Paroxetine, (5) Citalopram, (6) Norfluoxetine, (7) Nortriptyline, (8) Fluoxetine, (9) Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub> , (10) Desmethylsertraline, (11) Amitriptyline, (12) Sertraline.....	66
<b>Figure 2-5.</b> Investigated matrix effects of TC antidepressants, SSRIs and some of their metabolites expressed as ion suppression ratio.....	70
<b>Figure 3-1.</b> Mean concentrations of antidepressant in 100 mg of tissue extracts from brook trout exposed in mesocosms to 20% v/v of effluent at the Montreal WWTP.....	85
<b>Figure 3-2.</b> Extracted ion chromatogram (EIC) of DSER and SER from LC-MS/MS analysis of brook trout exposed to 20% v/v of effluent: (A) liver tissues extract, and (B) spiked liver tissues extract.....	89
<b>Figure 3-3.</b> Modulation <i>in vitro</i> of Na/K-dependent and Mg-dependent ATPase activity in the brain tissues by selected SSRIs following (A) added serotonin, and (B) pre-treatment with antidepressants.....	93



<b>Figure 3-4.</b> Modulation of nerve synapse Na/K-ATPase activity after diluted effluent exposure, n=6 (NT: not treated, Oz: Ozone treatment at 15 mg L <sup>-1</sup> ) .....	94
<b>Figure 3-5.</b> Mean recoveries (%) of antidepressant and estimated matrix effects (expressed as ion suppression vs. non-extracted standard solution) for 200 mg spiked tissue samples of fish (brain, liver, filet) and mussels (gonad, digestive gland).....	100
<b>Figure 4-1.</b> Representative FLUVO chromatogram of one raw sewage sample for two extracted multiple reactions monitoring (MRM) transitions.....	122
<b>Figure 4-2.</b> Comparison of mean removal rates obtained from STP B (secondary treatment, biological nutrient removal, summer) and STP N (primary treatment, chemically enhanced with alum and FeCl <sub>3</sub> , summer).....	122
<b>Figure 4-3.</b> Comparison of mean removal rates obtained from STP B (secondary treatment, biological process) in summer and winter.....	123
<b>Figure 4-4.</b> Comparison of mean removal rates obtained between STP B (secondary treatment, biological nutrient removal) and STP A (secondary treatment, trickling filter/solids contact).....	124
<b>Figure 4-5.</b> Matrix effects representation of spiked extracts: A) sewage wastewater (effluent and raw sewage), B) sewage sludge.....	131
<b>Figure 5-1.</b> Chemical structures of the studied compounds.....	138
<b>Figure 5-2.</b> Representative LC-QqQMS chromatograms of selected antidepressants detected in primary-treated effluent sample extracts.....	145

<b>Figure 5-3.</b> Relative $K_d$ values of the studied compounds.....	146
<b>Figure 5-4.</b> Reduction of antidepressants and CAR in primary-treated effluent by ozone disinfection at 5 and 9 mg L <sup>-1</sup> .....	148
<b>Figure 5-5.</b> LC-QqToFMS chromatograms of <i>N</i> -oxide by-products detected in disinfected effluent (O <sub>3</sub> , 5 mg L <sup>-1</sup> ).....	151
<b>Figure 5-6.</b> LC-QqToFMS mass spectra of <i>N</i> -oxide VEN in disinfected effluent (O <sub>3</sub> , 5 mg L <sup>-1</sup> ): product ions at 0 V collision energy (a) and 10 V collision energy (b).....	152
<b>Figure 5-7.</b> LC-QqToFMS mass spectra of <i>N</i> -oxide DVEN in disinfected effluent (O <sub>3</sub> , 5 mg L <sup>-1</sup> ): product ions at 0 V collision energy (a) and 10 V collision energy (b).....	153

## Liste d'abréviations, sigles et acronymes

---

Les mots écrits dans la langue anglaise sont indiqués en italique. Certains termes n'apparaissent que dans une langue étant donné qu'ils sont utilisés et connus que sous cette langue.

AcOH	Acide acétique; <i>Acetic acid</i>
ACN	Acétonitrile
AMI	Amitriptyline
ANOVA	Analyse de variance; <i>analysis of variance</i>
ATP	Adénosine triphosphate; <i>Adenosine triphosphate</i>
BAF	Filtration biologique aérobie; <i>Biological aerated filter</i>
BOD	Demande biochimique en oxygène; <i>Biochemical oxygen demand</i>
BNR	Enlèvement biologique des nutriments; <i>Biological nutrient removal</i>
BUP	Bupropion
CAR	Carbamazépine
CE	Électrophorèse capillaire; <i>Capillary electrophoresis</i>
CIDI	Interview diagnostique composite internationale
CIT	Citalopram
COD	Demande chimique en oxygène; <i>Chemical oxygen demand</i>
DBO <sub>5</sub>	Demande biochimique en oxygène
DFLUVO	Desmethylfluvoxamine
DHC	10,11-Dihydrocarbamazépine
DMIR	Desmethylmirtazépine
DOC	Carbone organique dissous; <i>Dissolved organic carbon</i>
DOM	Matière organique dissoute; <i>Dissolved organic matter</i>
DSER	Desméthylsertraline
DVEN	Desméthylvenlafaxine
EC <sub>50</sub>	Concentration effective à 50%

ENSP	Enquête nationale sur la santé de la population
ESI+	Ionisation par nébulisation électrostatique positive; <i>Positive Electrospray ionisation</i>
FLU	Fluoxétine
FLUVO	Fluvoxamine
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse; <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HRT	Temps de rétention hydraulique; <i>Hydraulic retention time</i>
I.D.	Diamètre interne; <i>Internal diameter</i>
ISTD ou IS	Standard interne; <i>Internal standard</i>
K <sub>d</sub>	Coefficient de sorption; <i>Sorption coefficient</i>
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse; <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem; <i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LC-QqToFMS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps d'envol; <i>Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry</i>
LC-QqQMS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec filtre quadripolaire; <i>Liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry</i>
LOD	Limite de détection; <i>Limit of detection</i>
LOEC	Plus petite concentration ayant un effet observable
Log K <sub>ow</sub>	Logarithme de la constante de partition octanol-eau
LOQ	Limite de quantification; <i>Limit of quantification</i>
MAOIs	Inhibiteurs de monoamine oxydase
MeOH	Méthanol
MIR	Mirtazépine

$m/z$	Rapport masse sur charge; <i>Mass-to-charge ratio</i>
NFLU	Norfluoxétine
NH <sub>4</sub> OH	Hydroxyde d'ammonium; <i>Ammonium hydroxide</i>
NTRI	Nortriptyline
PAR	Paroxétine
PhACs	Composés actifs pharmaceutiques; <i>Pharmaceutically-active compounds</i>
PLC	Chromatographie liquide pressurisée; <i>Pressurized liquid chromatography</i>
$r^2$	Coefficient de régression linéaire; <i>Linear correlation coefficient</i>
SER	Sertraline
SIM	Détection d'ions sélectionnés; <i>Single ion monitoring</i>
S/N	Rapport signal sur bruit de fond; <i>Signal-to-noise ratio</i>
SPE	Extraction sur phase solide; <i>Solid phase extraction</i>
SRT	Temps de rétention des solides; <i>Solids retention time</i>
SSRIs	Inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine; <i>Selective serotonin reuptake inhibitor</i>
TC	Tricyclique
$t_R$	Temps de rétention; <i>Retention time</i>
TFSC	Filtres rotatifs sans contact; <i>Trickling filter / solids contact</i>
TIC	Courant ionique total; <i>Total ion current</i>
TRA	Tramadol
VEN	Venlafaxine
WHO	Organisation mondiale de la santé; <i>World health organization</i>
WWTP	Usine d'épuration des eaux usées; <i>Wastewater treatment plant</i>

*À ma tendre épouse Marlène et mes enfants adorés Daphnée et Olivier pour leur support moral indéfectible, leur immense patience et leur amour infini.*

*Je vous aime...*

## Remerciements

---

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse de doctorat, tout spécialement :

Sébastien Sauvé, mon directeur de recherche, pour son encadrement, ses conseils judicieux et son accueil chaleureux.

Christian Gagnon, mon co-directeur de recherche, pour son encadrement, ses commentaires pertinents pendant les révisions d'articles et son aide lors des soumissions des manuscrits aux différents journaux scientifiques.

Pedro A. Segura et Paul Fayad pour certains conseils techniques au laboratoire.

Christian Blaise et François Gagné pour leurs encouragements tout au long de ces études.

Toute l'équipe d'Environnement Canada pour les échantillonnages et les autorisations permettant l'accessibilité aux installations de la station d'épuration de la ville de Montréal.

La ville de Montréal et au regretté Patrick-Jan Čejka (1951-2011) pour l'accès aux bassins d'expositions contrôlées et l'approvisionnement fréquente en eaux usées.

Le Plan action St-Laurent, Santé Canada et la Fondation canadienne pour l'innovation pour leur support financier.

## **Chapitre 1 : Introduction générale**

---



## **1.1. La dépression**

Selon l'Organisation mondiale de la santé (WHO), la dépression majeure est la quatrième cause d'incapacité au monde au 21<sup>ème</sup> siècle et deviendra d'ici 2020 le deuxième principal facteur contribuant au fardeau de la maladie dans les pays industrialisés (Patten et Juby, 2008; Conseil du médicament, 2011). En raison des coûts élevés de soins de santé s'y rattachant et de la perte de productivité au travail qu'elle entraîne, la dépression crée désormais de profondes répercussions économiques dans les sociétés (Stephens et Joubert, 2001).

Aussi surprenant que cela puisse paraître, les critères particuliers servant maintenant à reconnaître la dépression clinique n'ont été adoptés à l'échiquier mondial qu'en 1980 avec la publication de la troisième révision du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux par l'Association américaine de psychiatrie (DSM III, 1980). Ainsi, en définissant mieux la dépression majeure en fonction de la persistance et de la gravité des symptômes, les critères fournis dans ce manuel ont permis d'énoncer la toute première définition empirique des troubles dépressifs. Depuis ce jour, la recherche sur la dépression a grandement progressée.

### **1.1.1. Définition de la dépression clinique**

Répertoriée comme une maladie psychiatrique faisant partie des troubles de l'humeur (ou dysthymies), la dépression clinique est reconnue comme un syndrome caractérisé par un ensemble de symptômes tels que la perte d'intérêt ou de plaisir, les sentiments de culpabilité ou la faible estime de soi, le sommeil ou l'appétit perturbé, le manque d'énergie, une mauvaise concentration et des pensées suicidaires ou associées à la mort (Patten et Juby, 2008). De plus, elle est souvent accompagnée d'un autre problème psychiatrique comme un trouble de l'anxiété, de toxicomanie, d'alcoolisme ou

d'alimentation. Qu'elle soit diagnostiquée seule ou combinée à un autre problème, la dépression clinique mine la capacité de fonctionner à la maison, au travail et en société (Breslin et al., 2006). Selon les critères suggérés par l'interview diagnostique composite internationale (CIDI), au moins cinq des symptômes liés à l'humeur doivent être présents presque tous les jours au cours d'une période de deux semaines pour conclure à un possible diagnostic de dépression (Patten et Juby, 2008). Bien que nous ne connaissions pas encore parfaitement ses éléments déclencheurs, il semble que la dépression soit le produit d'une interaction complexe entre des éléments biologiques, psychologiques et sociaux.

### **1.1.2. Statistiques sur la dépression au Québec et au Canada**

Les premières études statistiques américaines ont révélé que la dépression était beaucoup plus répandue qu'on ne le croyait auparavant. Au milieu des années 90, l'Enquête Nationale sur la Santé de la Population (ENSP) de Statistique Canada est devenue la première étude complète au pays avec en complément une interview diagnostique sur la dépression majeure semblable à la version courte du CIDI (Patten et Juby, 2008). Au terme de cette enquête historique, il en est ressorti que la dépression était un problème de santé tout aussi grave au Canada qu'aux États-Unis.

De récentes estimations ont démontré qu'environ un canadien sur dix a vécu un épisode dépressif majeur à un moment donné de sa vie (Patten et Juby, 2008). Selon des informations contenues dans une banque de données provinciales, la consommation d'antidépresseurs au Québec a connu une croissance appréciable de 8.1 à 10.6% pour l'ensemble de la population entre 1999 et 2004 (Conseil du médicament, 2011).

Une autre étude canadienne menée par Cheung et Dewa (2006) auprès d'adolescents âgés entre 15 et 18 ans a montré que le risque de dépression était plus élevé chez les jeunes

en provenance du Québec que ceux issus de la région de l'Atlantique. Toujours au Québec, les données cumulées auprès de cohortes (5094 enfants : 2-14 ans; 11 121 adolescents : 15-19 ans) entre 1997 et 2005 ont permis de démontrer que les antidépresseurs tricycliques (TC) étaient davantage prescrits aux enfants par les psychiatres (Tournier et al., 2010). Par contre, les antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de recapture de sérotonine (SSRIs) ont été majoritairement utilisés pour traiter les adolescents souffrant de dépression et autres troubles psychiatriques.

Certaines données statistiques semblent démontrer que la consommation d'antidépresseurs n'est pas exclusivement associée aux épisodes de dépression. En effet, selon les résultats d'un sondage canadien d'envergure nationale sur les maladies mentales (*Canadian Community Health Survey Cycle 1.2*) mené en 2002, 5.8% des Canadiens ont déclaré avoir pris des antidépresseurs dans l'année précédente pour une prévalence annuelle d'épisodes de dépressions majeures établie à 4.8% (Conseil du médicament, 2011). Parmi les gens ayant vécu un épisode dépressif majeur, la fréquence d'utilisation d'antidépresseurs était 40.4%. Donc, il appert que les antidépresseurs ont été utilisés pour de nombreuses indications autres que le traitement de la dépression.

En plus des facteurs de risque ressortant des études cliniques (i.e. l'hérédité, la violence subie pendant l'enfance ou d'autres troubles psychiatriques), les études épidémiologiques font systématiquement état de taux plus élevés de dépression majeure chez la femme et les jeunes adultes, chez les célibataires ou les individus jadis mariés (veufs, séparés ou divorcés) et chez les faibles salariés (Patten et Juby, 2008). Toutefois, les aînés qui voient leurs fonctions physiques et émotionnelles décroître avec l'augmentation de leur espérance de vie font maintenant de plus en plus partie des gens souffrant de dépression majeure (Bowen, 2009).

### 1.1.3. Mécanismes biochimiques de la dépression

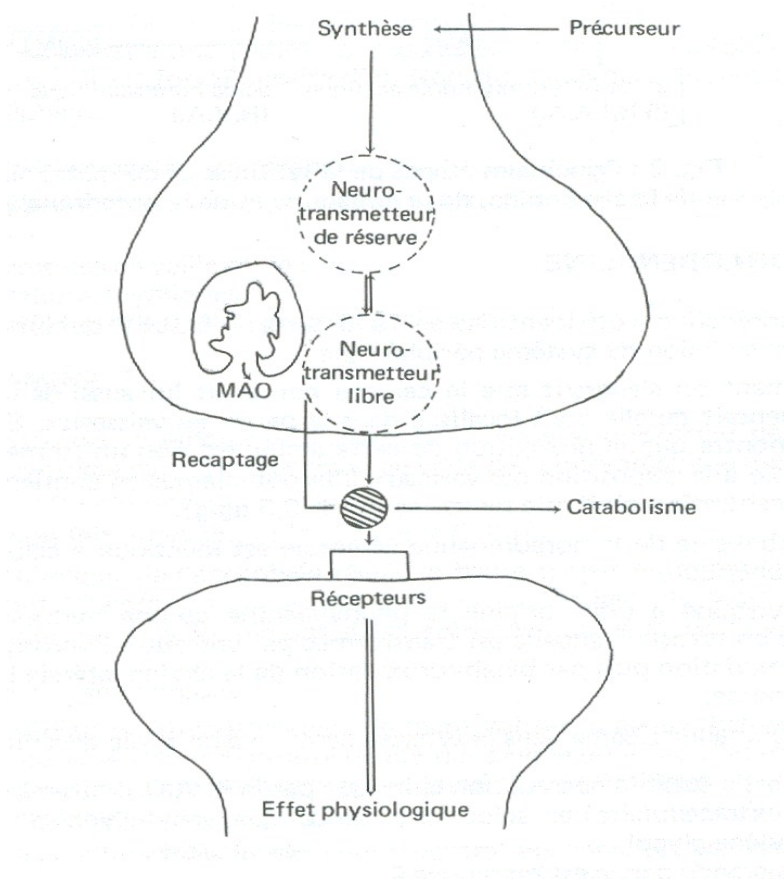
À ce jour, les processus biochimiques impliqués dans les épisodes dépressifs d'un individu sont plus ou moins compris par les nombreux scientifiques œuvrant en psychiatrie. Néanmoins, certaines études complétées en laboratoire ont permis l'avancement de notre niveau de compréhension vis-à-vis cette maladie. L'état actuel des connaissances nous permet aujourd'hui de confirmer le rôle important que jouent certaines hormones, de petits messagers chimiques appelés neurotransmetteurs et certains récepteurs qui leur sont associés à l'intérieur de zones précises du cerveau.

#### 1.1.3.a. Les hormones glucocorticoïdes

Lorsqu'une personne subit un événement stressant ou perçoit un danger son corps active successivement une cascade de réactions biochimiques qui augmente son taux de glucocorticoïdes sanguin. Brièvement, le relâchement de glucocorticoïdes entraîne via des récepteurs spécifiques dans l'hippocampe une activation de l'hypothalamus qui sécrète une hormone nommée CRH « *corticotropin-releasing hormones* ». La CRH amène à son tour l'hypophyse à produire l'hormone ACTH (adrénocorticotropine) qui circule dans le système sanguin et atteint les glandes surrénales où elles provoquent la libération de cortisol (INSMT, 2012). Ce processus forme une boucle de rétroaction négative où l'excès de cortisol active les récepteurs aux glucocorticoïdes du cerveau et supprime la production de CRH. Toutefois, chez les patients sérieusement déprimés ayant subi un stress chronique cette boucle ne fonctionne plus d'où une production excessive de CRH, et par conséquent de cortisol sanguin (INSMT, 2012). A priori, les glucocorticoïdes jouent un rôle extrêmement important dans les réactions de peur, d'anxiété et dans les états dépressifs en altérant certains récepteurs sérotoninergiques.

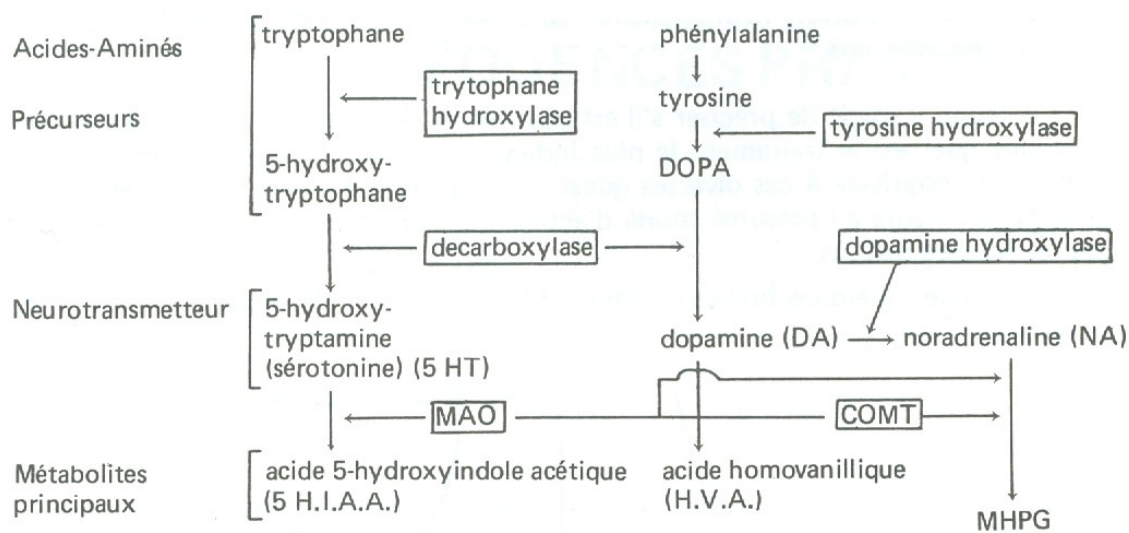
### 1.1.3.b. Les neurotransmetteurs et récepteurs associés

Malgré l'association faite entre hauts taux sanguin de cortisol et dépression, d'autres éléments importants semblent impliqués dans les mécanismes biochimiques de la dépression. En effet, plusieurs chercheurs pensent que certains messagers chimiques appelés neurotransmetteurs influencent grandement le passage du flux nerveux dans un neurone à la jonction de la synapse et la fente synaptique dans le cerveau (Bourin, 1983). Un schéma d'une synapse est représenté à la **Figure 1-1**.



**Figure 1-1.** Schéma d'une synapse humaine et ses principales composantes (Bourin, 1983).

Les monoamines forment deux sous-classes de neurotransmetteurs : les catécholamines (dopamine, adrénaline et noradrénaline) et les indoleamines (sérotonine ou 5-hydroxy-tryptamine, 5-HT). Selon les hypothèses suggérées, les neurotransmetteurs les plus couramment impliqués dans le mécanisme biochimique de la dépression seraient la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine (Bourin, 1983). Un schéma des principales étapes de synthèse et du métabolisme de ces différents neurotransmetteurs est représenté dans la **Figure 1-2**.



**Figure 1-2.** Schéma des principales étapes de synthèse et du métabolisme des neurotransmetteurs impliqués dans le mécanisme de la dépression (Bourin, 1983).

Une première hypothèse dite permissive des amines et des désordres affectifs ou « *Permissive amine hypothesis of effective disorders* » émise par Schildkraut (1965) a été longtemps acceptée par la communauté de psychiatrie. Malgré ses limitations, ce modèle élégant proposait déjà à l'époque la participation active de neurotransmetteurs tels la norépinephrine et la sérotonine dans le contrôle de l'humeur. Toutefois, cette hypothèse n'apportait aucune explication quant au long temps de réponse nécessaire pour abaisser les symptômes de dépression suite à une prise de médication initiale (délais pouvant atteindre jusqu'à plusieurs semaines).

Quelques années plus tard, des chercheurs ont apportés certaines précisions au modèle précédent. Ils ont notamment suggérés une variation du rôle et du nombre de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans les synapses suite à une prise d'antidépresseurs à dose chronique (Leonard et Spencer, 1990). Certes, l'une des hypothèses encore défendues à ce jour stipule qu'un niveau insuffisant de neurotransmetteurs à l'extérieur de la cellule dans la fente synaptique d'un neurone ne permettrait pas un bon échange du flux nerveux à l'interface de plusieurs récepteurs spécifiques (Bourin, 1983). Un phénomène de recapture des neurotransmetteurs par l'entremise de protéines de transport transmembranaires aux abords du neurone accentuerait ce déséquilibre en remplaçant ces derniers à l'intérieur des cellules dans les vésicules de conservation (Richard, Senon et Tournier, 2006). Toutefois, d'autres scientifiques croient que les récepteurs de neurotransmetteurs pourraient jouer un rôle beaucoup plus important qu'on ne le croit dans le mécanisme de la dépression. À ce sujet, une équipe de pharmacologues du Karolinska Institute en Suède et de la Faculté de pharmacie de Rouen (CNRS) en France vient récemment de préciser la fonction d'un des récepteurs sérotoninergiques impliqué dans la régulation de l'humeur. Selon ces chercheurs, une protéine cytoplasmique S100 (p11) assurant la translocation des récepteurs au niveau membranaire augmenterait la disponibilité du récepteur 5-HT<sub>1B</sub> aux molécules de sérotonine (Svenningsson et al., 2006).

Finalement, une autre hypothèse évoquerait la possibilité que les dépressions récurrentes se rapprocheraient davantage d'une maladie dégénérative où des cellules et des connexions nerveuses sont endommagées ou détruites (INSMT, 2012). En effet, de récentes expériences ont démontrées qu'il pouvait naître jusqu'à 70% de nouveaux neurones dans l'hippocampe de rats traités au Prozac<sup>TM</sup> (fluoxétine) en comparaison aux cerveaux de rats normaux non traités (INSMT, 2012). La découverte de cette neurogenèse a été également observée dans l'hippocampe du cerveau humain adulte. D'ores et déjà, il semble maintenant bien établi qu'une augmentation de sérotonine dans le cerveau favoriserait le développement de nouveaux neurones. Ces observations renforcent donc l'hypothèse d'un possible lien entre la dépression et la neurogenèse. À l'inverse, une période de stress intense ou prolongé peut déclencher une dépression par l'induction de glucocorticoïdes reconnus pour diminuer la neurogenèse et même détruire les neurones dans le gyrus dentelé de l'hippocampe (INSMT, 2012). Malgré cette percée prometteuse, la recherche se poursuit.

## **1.2. Les antidépresseurs**

### **1.2.1. Classification**

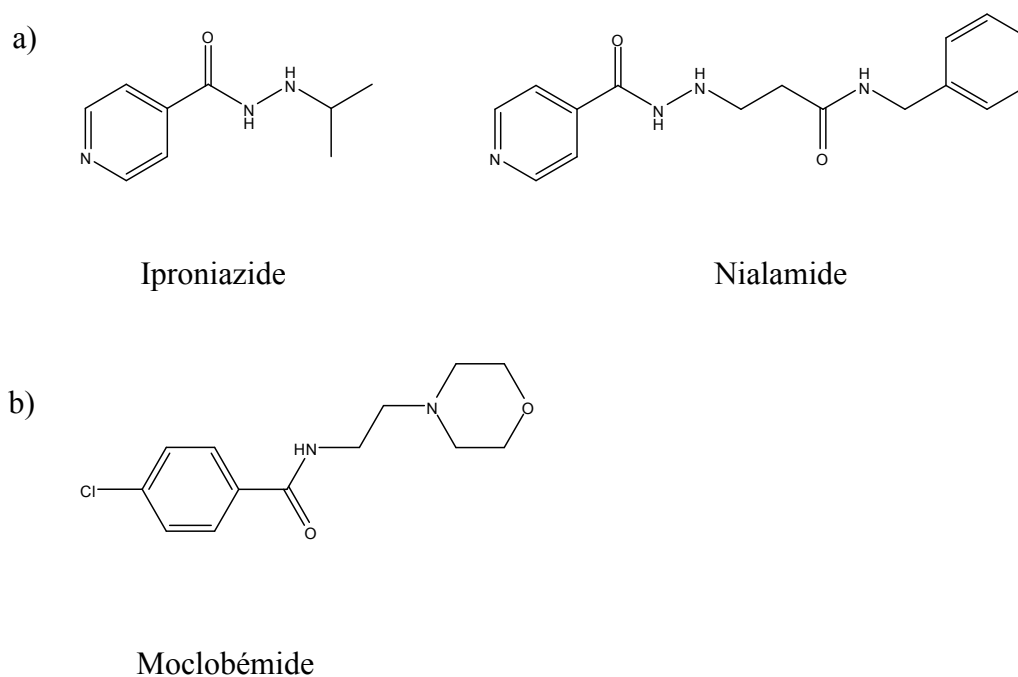
Les antidépresseurs sont des médicaments psychoactifs (psychoanaleptiques) améliorant l'humeur déprimée en agissant sur l'ensemble du syndrome dépressif (Richard, Senon et Tournier, 2006). Tel qu'abordé dans la section précédente, la dépression résulte d'altérations complexes et simultanées des différents systèmes de neurotransmission centraux, avec diminution des taux synaptiques de noradrénaline, de dopamine et de sérotonine. De ce fait, les différents antidépresseurs développés ont donc comme mandat de rétablir progressivement la dynamique des systèmes de neurotransmission, essentiellement par inhibition de la recapture des monoamines (noradrénaline, sérotonine, ou dopamine) plus au moins spécifique d'un ou plusieurs récepteurs, ou d'autres moyens parfois encore



non élucidés (Richard, Senon et Tournier, 2006). Pour des raisons pratiques, les psychiatres distinguent les antidépresseurs selon leurs mécanismes d'action ou leurs structures chimiques apparentes.

#### *1.2.1.a. Inhibiteurs de monoamine oxydase (MAOIs)*

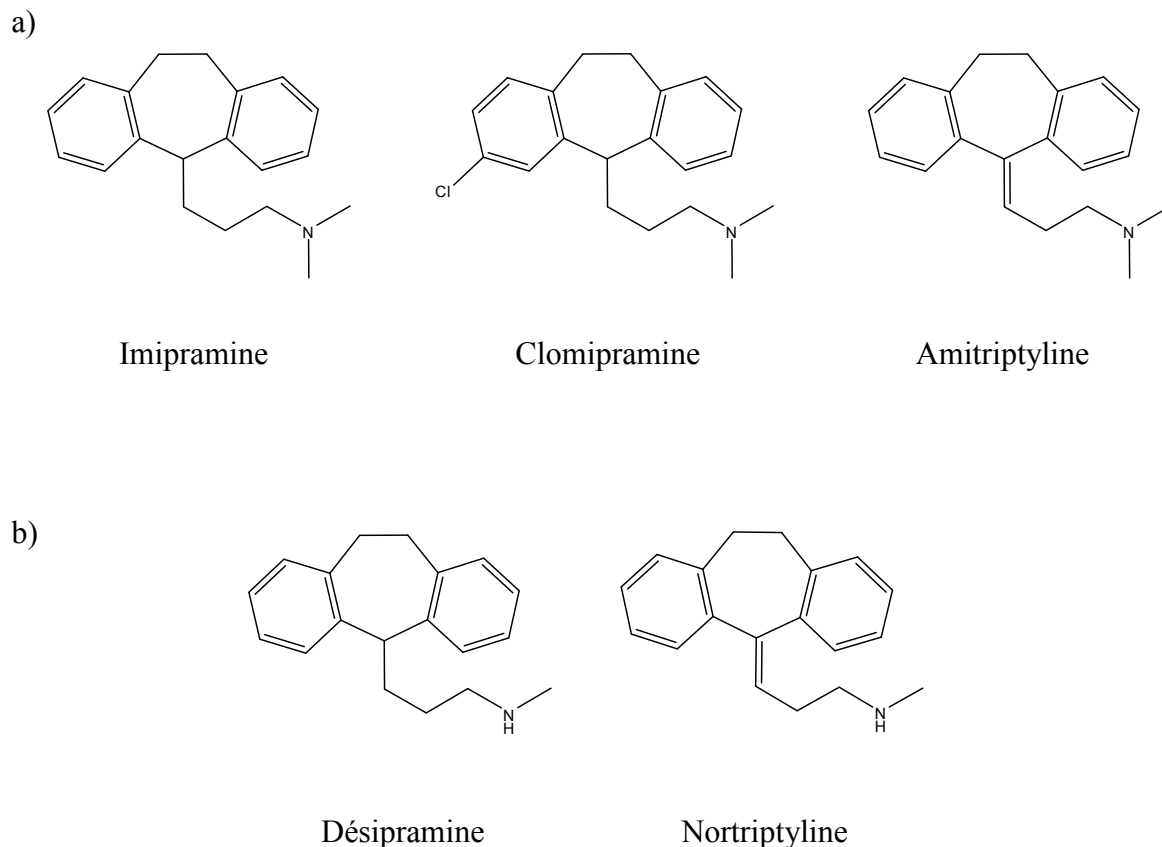
Commercialisés dans les années cinquante, les inhibiteurs de monoamine oxydase (MAOIs) font partie des premiers antidépresseurs utilisés dans les cliniques psychiatriques. Beaucoup moins prescrits aujourd'hui à cause de leurs nombreux effets secondaires, les MAOIs augmentent la concentration synaptique en neurotransmetteurs de façon réversible ou irréversible par une diminution de leur dégradation : ils inhibent les monoamines oxydase (MAO), enzymes actives sur les monoamines et isolées de la plupart des tissus, dont ceux du cerveau où elles se concentrent dans les terminaisons pré-synaptiques (Richard, Senon et Tournier, 2006). La première génération de MAOIs est constituée de médicaments peu spécifiques et sélectifs tels que l'iproniazide (Marsilid®) et le nialamide (Niamide®) de la famille des hydrazines (**Figure 1.3**). Le mode d'action irréversible bloque la MAO B indispensable au métabolisme de la tyramine et des molécules sympathomimétiques exogènes, générant des risques importants d'hypertension incontrôlable (Bourin, 1983). Leur prescription au Canada est maintenant interdite. Principe actif plus récent et désormais utilisé en pratique, le moclobémide (Moclamine®) exerce quant à lui une action réversible spécifique et sélective durant quelques heures sur l'enzyme MAO B tout en limitant les effets secondaires pour le patient (**Figure 1-3**).



**Figure 1-3.** Structures chimiques de quelques antidépresseurs de la classe des MAOIs avec action a) irréversible, b) réversible.

#### 1.2.1.b. Tricycliques (TC)

Fondamentalement, il existe trois familles d'antidépresseurs tricycliques (TC) qui se regroupent en deux types d'amines : les amines tertiaires, les amines secondaires qui sont elles-mêmes des métabolites actifs des amines tertiaires chez l'homme (Bourin, 1983). Des exemples de familles d'antidépresseurs TC sont représentés dans la **Figure 1-4**.



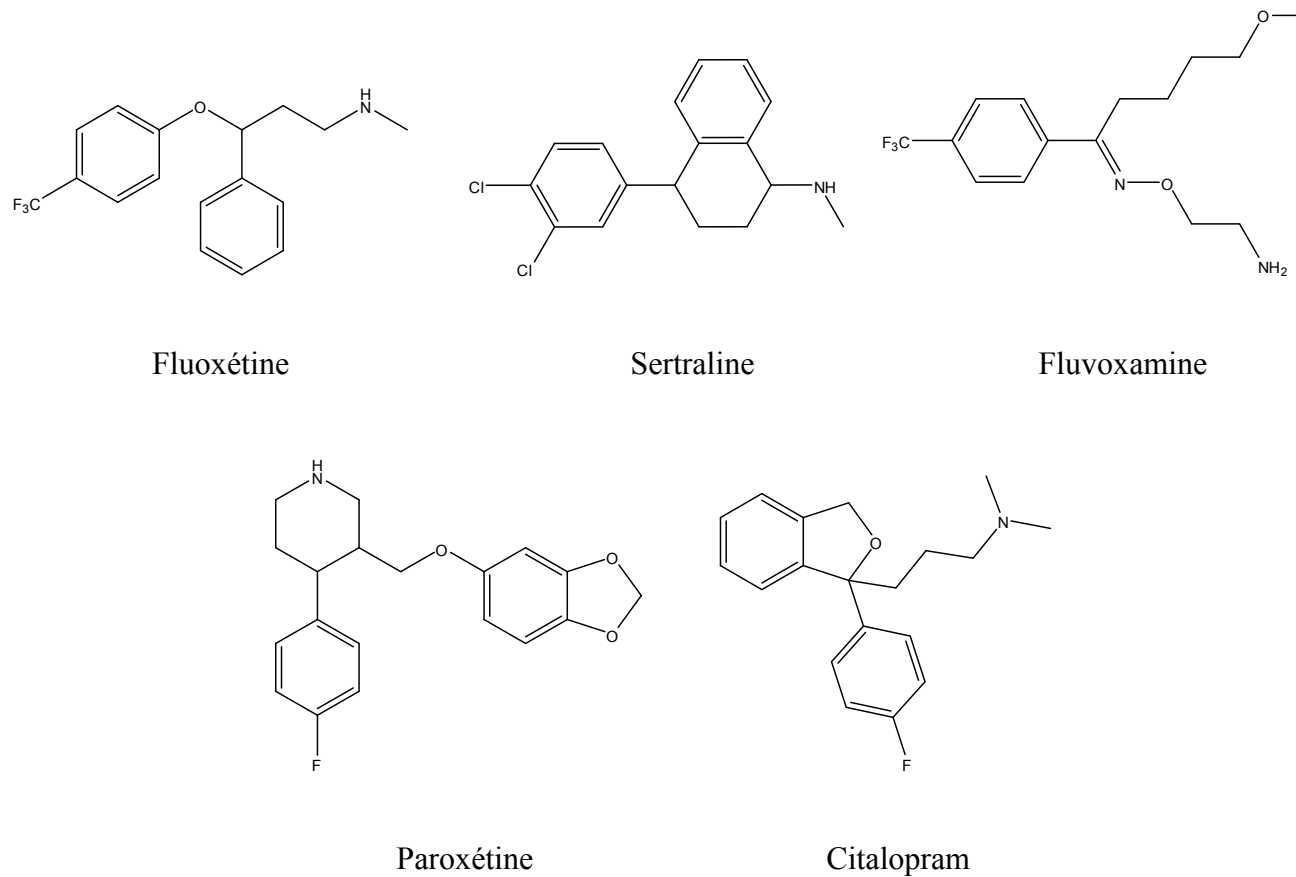
**Figure 1-4.** Principales familles d'antidépresseurs TC avec amines a) tertiaires, b) secondaires.

Les antidépresseurs TC agissent en freinant la recapture des neurotransmetteurs, par la fente pré-synaptique, au niveau du système nerveux central. L'imipramine (Tofranil®) et surtout l'un de ses dérivés, la clomipramine (Anafranil®), font référence dans le traitement de la dépression en présentant l'une des plus grandes efficacités parmi l'ensemble des antidépresseurs en bloquant la recapture de la sérotonine. Parmi d'autres antidépresseurs TC disponibles au Canada, mentionnons l'amitriptyline (Élavil®), mais également la désipramine (Norpramine®) et la nortriptyline (Aventyl®) qui agissent davantage sur la recapture de la noradrénaline (Richard, Senon et Tournier, 2006). Les antidépresseurs TC sont utilisés lors d'épisodes dépressifs majeurs car ce sont les médicaments les plus

puissants dans ce domaine. Cependant, ces mêmes antidépresseurs ont d'autres actions par liaison à certains récepteurs post-synaptiques (H1 ou histaminergiques,  $\alpha$ -adrénergiques, muscariniques, etc.), d'où leurs nombreux effets indésirables et leur profil de tolérance souvent médiocre (Bourin, 1983; Richard, Senon et Tournier, 2006). Fait intéressant à mentionner, l'antidépresseur amitriptyline est aussi administré aux animaux souffrant d'anxiété de séparation, de troubles obsessionnels compulsifs et de peurs (Halling-Sørensen, 1998; Mills, 2003).

#### *1.2.1.c. Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRIs)*

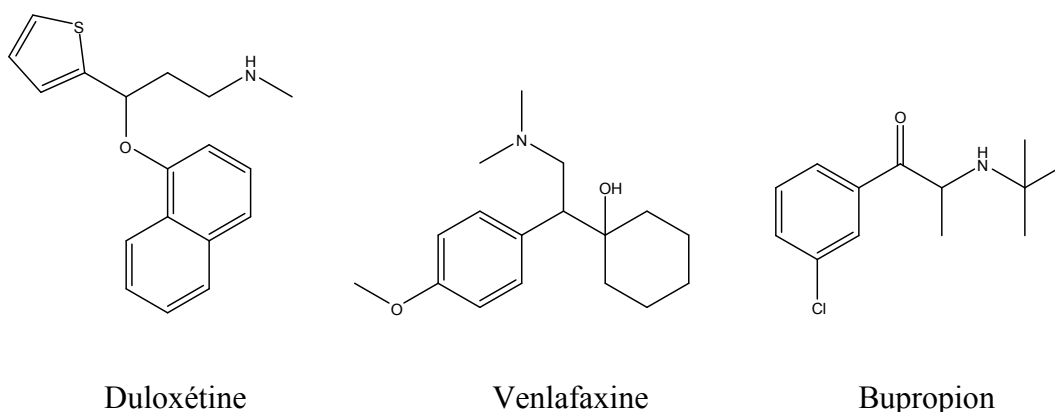
De façon similaire aux antidépresseurs TC, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (SSRIs) agissent eux aussi sur le site transporteur permettant la recapture de la sérotonine par le neurone pré-synaptique. Toutefois, leurs actions plus spécifiques de blocage des pompes à recapture donnent lieu à beaucoup moins d'effets indésirables que les antidépresseurs TC qui affectent différents récepteurs dans la fente pré-synaptique (INSMT, 2012). Très maniables, les SSRIs sont tout à fait indiqués pour le traitement des épisodes dépressifs majeurs, mais également pour les diagnostics de troubles d'anxiété (Richard, Senon et Tournier, 2006). Parmi les SSRIs connus figurent la fluoxétine (Prozac®), le citalopram (Celexa®), le fluvoxamine (Floxyfral®), la sertraline (Zoloft®), et la paroxétine (Paxil®) (**Figure 1-5**).



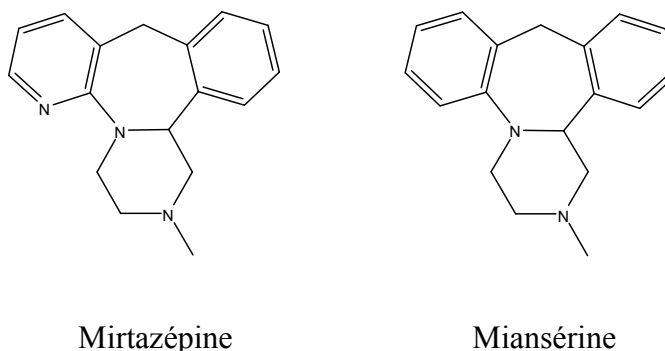
**Figure 1-5.** Structures chimiques de quelques antidépresseurs de la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRIs).

### 1.2.1.d. Inhibiteurs mixtes (double action) et autres antidépresseurs

Les antidépresseurs inhibiteurs mixtes ou à « double action » inhibent la recapture de deux neurotransmetteurs et sont dépourvus d'action postsynaptique directe, notamment sur les récepteurs spécifiques de ces neurotransmetteurs (Richard, Senon et Tournier, 2006). Par exemple, la duloxétine (Cymbalta®) et la venlafaxine (Effexor®) inhibent la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (**Figure 1-6**). Par ailleurs, d'autres antidépresseurs ne sont pas considérés comme des inhibiteurs mixtes malgré leur double action. En effet, la mirtazépine (Remeron®) n'inhibe pas la recapture de neurotransmetteurs, mais agit spécifiquement sur la neurotransmission noradrénergique et sérotoninergique centrale du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> lorsque le récepteur  $\alpha_2$  est bloqué par l'action directe de cet antidépresseur sur les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> et 5-HT<sub>3</sub> (Gorman, 1999). La mirtazépine tout comme la miansérine (Athymil®) font partie de la classe d'antidépresseurs tétracycliques (**Figure 1-6**). Parmi les autres antidépresseurs utilisés en thérapie, mentionnons le bupropion (Zyban®) prescrit pour les fumeurs chroniques lors d'un sevrage à la nicotine. Cet antidépresseur inhibe la recapture de la dopamine et de la noradrénaline dans les régions limbiques du cerveau (Richard, Senon et Tournier, 2006).



**Figure 1-6.** Structures chimiques de quelques antidépresseurs de la classe des inhibiteurs mixtes (double action) et autres antidépresseurs.



**Figure 1-6 (suite).** Structures chimiques de quelques antidépresseurs de la classe des inhibiteurs mixtes (double action) et autres antidépresseurs.

### 1.3. Les antidépresseurs dans l'environnement

#### 1.3.1. Sources et transport

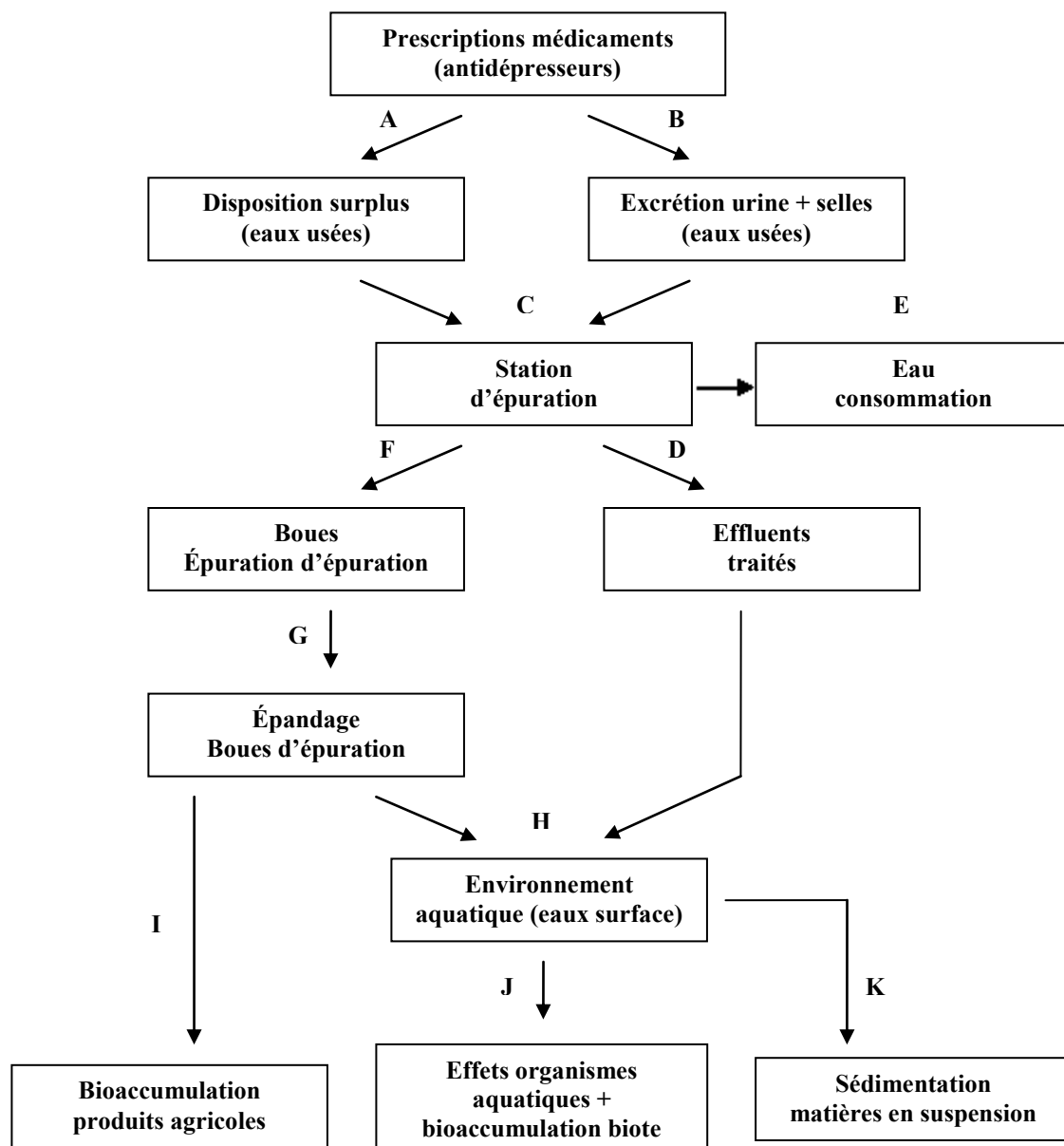
Contrairement aux croyances populaires, les sources principales d'antidépresseurs (**Figure 1-7**) ne proviennent pas de la disposition de médicaments périmés (A) mais bien des excréctions des patients (B) traités pour divers troubles psychiatriques (Cunningham et al., 2006; Calisto et Esteves, 2009). Les antidépresseurs (comme plusieurs autres produits pharmaceutiques) sont métabolisés majoritairement par le corps humain dans le foie en métabolites de type I (i.e. réactions de déméthylation, d'oxydation) ou II (i.e. réaction de conjugaison avec l'acide glucuronique ou un groupement sulfate) afin d'augmenter leur polarité et de faciliter leur évacuation via l'urine et les selles dans les égouts (Halling-Sørensen et al., 1998; Heberer, 2002). Par la suite, les eaux usées domestiques et celles des hôpitaux sont acheminées vers des stations d'épuration (C) où elles sont traitées en appliquant un ou plusieurs procédés pour en diminuer les solides en suspension, la demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>), le phosphore total ainsi que l'ammoniaque (Ternes, Joss et Siegrist, 2004). Cependant, les stations d'épuration bâties par les municipalités il y a quelques décennies n'ont pas été conçues en premier plan pour éliminer

certaines produits pharmaceutiques (en l'occurrence les antidépresseurs) et par conséquent, ceux-ci sont souvent retrouvés en presque totalité dans les effluents (D), l'environnement aquatique (H) ou même en traces dans l'eau de consommation (E) (Snyder, 2008; Togola et Budzinski, 2008; Metcalfe et al., 2010).

Dans les stations d'épuration, les antidépresseurs peuvent être éliminés des eaux usées, cependant ils peuvent également se retrouver dans les boues d'épuration (F) (Radjenović et al., 2009). L'épandage de ces boues (F) en milieu agricole (I) génère une autre voie de transport des antidépresseurs dans l'environnement. En effet, une étude a démontrée récemment une bioaccumulation de fluoxétine dans le chou-fleur « *Brassica oleracea* » au niveau de la tige ( $0.49 \mu\text{g g}^{-1}$  poids humide) et des feuilles ( $0.26 \mu\text{g g}^{-1}$  poids humide) lors d'expérimentations menées en laboratoire sous conditions contrôlées avec des boues d'épuration contenant initialement  $280 \text{ ng L}^{-1}$  de cet antidépresseur (Redshaw, Wootton et Rowland, 2008a). Selon Wu et al. (2010), la bioaccumulation de produits pharmaceutiques par l'épandage de boues d'épuration est spécifique à chacun des composés présents et dépend de divers facteurs touchant son hydrophobicité. Pour les antidépresseurs qui sont en majorité des bases faibles, la bioaccumulation par sorption dépend donc de leurs valeurs de pKa respectives et du pH du substrat utilisé (Wu et al., 2010). Tel que représenté dans la **Figure 1-7**, de fortes précipitations sur les champs traités avec des boues d'épuration peut causer des ruissellements et de l'érosion pour transporter les résidus pharmaceutiques vers l'environnement aquatique (H) (Boxall, 2004).

Libérés dans les fleuves et les rivières, les antidépresseurs peuvent aussi exercer des effets pharmacologiques indésirables sur certains organismes aquatiques par bioaccumulation dans certains tissus spécifiques (J). D'ailleurs, cette problématique sera abordée de façon approfondie à la section 1.5. Finalement, les antidépresseurs dissous dans les eaux de surface peuvent soit s'associer à la matière en suspension ou précipiter avant de se déposer sur les sédiments au fond des cours d'eau à quelques kilomètres du





**Figure 1-7.** Routes anticipées des antidépresseurs dans l'environnement.

point de rejet des stations d'épuration (K). Bien que peu comprise jusqu'ici, la sédimentation des antidépresseurs implique l'adsorption des antidépresseurs sur la phase particulaire. Cette adsorption est influencée par divers paramètres tel que la température et le pH de l'eau réceptrice, mais également le pKa et l'hydrophobicité des molécules concernées (Schultz et al., 2010; Hörsing et al., 2011).

## **1.4 Devenir des antidépresseurs**

### **1.4.1. Devenir dans les stations d'épuration**

Le transport des antidépresseurs dans l'eau mène en quelque sorte à leur diminution en concentration depuis leur source jusqu'au point de déversement. Fondamentalement, cette diminution aussi observée avec d'autres contaminants est causée par trois facteurs prédominants qui définissent principalement leur cycle de vie : la dilution, la sorption et la dégradation ou persistance (Segura, 2009).

#### *1.4.1.a. La dilution*

Une fois rejetés dans les eaux domestiques, les antidépresseurs subissent généralement une dilution par le mélange avec les eaux usées ne contenant pas ces substances. Ce phénomène de dilution est essentiel lorsque les effluents sont rejetés par les stations d'épuration puisque les cours d'eau ayant les plus faibles débits par rapport aux charges d'eaux déversées présentent en proportion des concentrations plus élevées de contaminants (Segura, 2009). Malgré la dilution apportée, certains antidépresseurs tels que la fluoxétine et le venlafaxine ont été détectés à l'état de traces dans l'environnement aquatique à des concentrations variant entre  $\text{ng L}^{-1}$  et  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Schultz et Furlong, 2008; Metcalfe et al., 2010).

#### *1.4.1.b. La sorption*

Certains antidépresseurs ont la capacité de sorption sur la matière organique, les sédiments ou les argiles par des interactions hydrophobes et électrostatiques impliquant des forces ioniques, des ponts hydrogènes et en moindre proportion des complexes avec des métaux (Kwon et Armbrust, 2008). La capacité de sorption aux solides est exprimée par le coefficient de sorption  $K_d$ . De façon empirique, ce coefficient nous renseigne sur le ratio existant entre la concentration d'une substance dans le sorbant et sa concentration dans la phase aqueuse à l'équilibre (Kwon et Armbrust, 2008). Parmi les rares études complétées sur le sujet, Hörsing et ses collaborateurs ont rapporté quelques valeurs expérimentales de  $K_d$  d'antidépresseurs à partir de boues d'épuration provenant d'un traitement primaire physico-chimique (540 - 35 000 L kg<sup>-1</sup>) et secondaire biologique (100 – 17 000 L kg<sup>-1</sup>) (Hörsing et al., 2011). Ainsi, l'étendue marquée des valeurs  $K_d$  obtenues dans ces travaux suggère une mobilité variable des antidépresseurs suite à un traitement en station d'épuration.

De façon générale, les antidépresseurs SSRIs possèdent des capacités de sorption supérieures à 91%, cependant ces valeurs ne peuvent s'expliquer par des coefficients de partition octanol-eau ( $K_{ow}$ ) élevés (Kwon et Armbrust, 2008). Rappelons que les valeurs de  $K_{ow}$  sont utilisées pour prédire l'hydrophobicité des composés (Sabljić et al., 1995). Pour des composés pharmaceutiques neutres et hydrophobes, le mécanisme de sorption peut être associé à la teneur en carbone organique d'une biomasse, d'un sol ou des sédiments et par conséquent être corrélé une valeur de  $K_{ow}$ . Dans le cas particulier des SSRIs, les valeurs de log  $K_{ow}$  varient faiblement entre 1.00 à 1.40 avec des valeurs de solubilité relativement élevées dans l'eau (3.022 – 15.460 mg L<sup>-1</sup>) (Calisto et Esteves, 2009). Ainsi, les interactions hydrophobiques ne peuvent justifier à elles seules le mécanisme de sorption des antidépresseurs, et conséquemment le coefficient  $K_{ow}$  n'est pas un paramètre adéquat pour prédire le devenir de ces composés (Kwon et Armbrust, 2008). En fait, tel que suggéré par

Wells (2006), le coefficient de distribution octanol-eau à pH dépendent ( $D_{ow}$ ) pourrait s'avérer un meilleur paramètre physico-chimique pour prédire la distribution des antidépresseurs entre les phases liquide et particulaire. Ce coefficient qui représente une combinaison de  $K_{ow}$  et de  $pK_a$  tient compte à la fois du caractère hydrophile d'une molécule pharmaceutique et du pH du milieu dans lequel elle se retrouve (Wells, 2006).

En dépit de leur solubilité dans les milieux aqueux, les antidépresseurs possèdent une certaine affinité pour la matière organique. Des concentrations de fluoxétine ( $123 \text{ ng g}^{-1}$ ) et de paroxétine ( $41 \text{ ng g}^{-1}$ ) ont été rapportées en Espagne dans les boues traitées d'une station d'épuration près de Barcelone (Radjenović et al., 2009). Une autre étude menée par Schultz et ses collaborateurs aux États-Unis dans la région du Colorado a confirmé également la présence d'antidépresseurs dans les sédiments prélevés au fond de la Rivière Boulder Creek (Schultz et al., 2010).

#### *1.4.1.c. La dégradation ou persistance*

Les stations d'épuration qui rejettent continuellement des résidus de produits pharmaceutiques dans l'environnement sont considérées à juste titre comme l'une des principales sources de contamination aquatique. Le type et l'abondance d'antidépresseurs retrouvés dans les rejets urbains et/ou boues d'épuration à travers le monde dépend en majeure partie du taux de consommation local (Buchberger, 2007). Actuellement, les taux d'efficacité des stations d'épuration pour l'abattement des produits pharmaceutiques varient de presque zéro à un enlèvement presque total des substances, dépendamment des méthodes de traitement plus ou moins sophistiquées utilisées et des substances en présentes (Calisto et Esteves, 2009). Suite à l'enlèvement des antidépresseurs dans la phase liquide, il est inapproprié de conclure à leur disparition complète puisqu'ils peuvent se retrouver dans la phase solide (i.e. boues de traitement) ou exister sous une forme différente suite à une transformation chimique dans le milieu (Halling-Sørensen et al., 1998).

Des données publiées sur la biodégradabilité de la fluoxétine et son métabolite norfluoxétine ont révélées que ces molécules possédant un potentiel d'activité pharmacologique élevé figurent parmi les résidus pharmaceutiques les plus résistants dans l'environnement (Redshaw et al., 2008b). D'ailleurs, certaines expérimentations ont déjà démontré la résistance de ces molécules aux processus de biodégradation dans les matrices environnementales liquides et les boues activées de stations d'épuration où sont omniprésents divers types de bactéries (Kwon et Armbrust, 2006; Redshaw et al., 2008b). D'un point de vue des dégradations hydrolytique et photolytique, la fluoxétine est réputée comme étant relativement stable dans l'environnement aquatique avec des temps de demi-vie supérieurs à 100 jours (Kwon et Armbrust, 2006). Alors que les taux d'enlèvement de la fluoxétine dans les stations d'épuration demeurent plutôt faibles ( $< 20\%$ ) après traitement primaire physico-chimique (i.e. floculation  $\text{FeCl}_2$  ou alum), il appert que certains traitements avancés tel que l'ozonation ou une combinaison ozone /  $\text{H}_2\text{O}_2$  s'avèrent beaucoup plus efficace à enlever ou dégrader les antidépresseurs avec des rendements  $\geq 98\%$  (Shon et al., 2006; Snyder, 2008).

## 1.4.2. Devenir environnemental

### 1.4.2.a. Milieux aquatiques

Le devenir environnemental des antidépresseurs est tributaire des propriétés physico-chimiques de chacune de ces substances, mais également des conditions du milieu où elles sont déversées. D'un point de vue chimique, la majorité des antidépresseurs sont des bases faibles (i.e. pKa : 6-10) possédant une fonction amine secondaire ou tertiaire (Wille et al., 2005). Cette caractéristique commune leur confère des propriétés ioniques qui favorisent grandement leur solubilité dans les milieux aquatiques. Ainsi, à pH neutre dans les lacs et rivières, certains antidépresseurs ont récemment été détectés aux États-Unis et au Canada en eaux de surface sous leur forme dissoute ionisée (Schultz et Furlong, 2008; Metcalfe et al., 2010).

Tel que mentionné brièvement à la section 1.3.1, les antidépresseurs ne sont pas complètement métabolisés par le corps humain et sont excrétés intacts ou comme métabolites dans les rejets municipaux (Heberer, 2002). Selon De Vane (1999), moins de 12% d'antidépresseurs SSRI sont excrétés dans l'urine sous leur forme originale, souvent accompagnés de métabolites desméthyles de type I possédant encore une activité pharmacologique capable de contribuer à l'inhibition de la recapture de la sérotonine. À titre d'exemple, des études *in vivo* ont démontrées que l'activité du métabolite desméthyle sertraline est égale au huitième des effets de sa molécule mère, la sertraline (Fuller et al., 1995). Les métabolites conjugués (i.e. glucuroniques, sulfates) quant à eux doivent également pris en compte puisque le haut niveau de bactéries *Escherichia Coli* présent dans les eaux usées causent un relâchement systématique des molécules mères dans l'environnement suite à une action des d'enzymes  $\beta$ -glucuronidase dans le milieu (Jones, Voulvoulis et Lester, 2005).

#### *1.4.2.b. Bioaccumulation chez les organismes aquatiques*

Étant donné les volumes quotidiens d'effluent déversés dans les écosystèmes aquatiques, des contaminations du biote (i.e. plantes, micro-organismes et animaux vivant dans un milieu) sont désormais de plus en plus observées. Le devenir des antidépresseurs ne s'arrête pas aux effluents traités mais se poursuit sous forme de bioaccumulation chez certaines espèces aquatiques vivant à proximité des points de décharge des stations d'épuration. Par exemple, des teneurs d'antidépresseurs supérieures à  $0.1 \text{ ng g}^{-1}$  ont été rapportées majoritairement dans le foie et le cerveau de poissons d'eau douce pêchés dans un ruisseau près du comté de Denton au Texas, États-Unis (Brooks et al., 2005). Parmi les antidépresseurs détectés figurent les SSRIs fluoxétine et sertraline accompagnés de leurs métabolites *N*-desméthyle respectifs norfluoxétine et desméthylesertraline. Au port d'Hamilton dans le lac Ontario (Canada), des spécimens d'aloise à gésier et de barbotte capturés près de rejets municipaux ont démontrés des traces de paroxétine, de fluoxétine et de norfluoxétine avoisinant  $1.0 \text{ ng g}^{-1}$  suite aux analyses des homogénats de ces poissons (Chu et Metcalfe, 2007). Plusieurs facteurs, dont le pH du milieu et la concentration de l'antidépresseur en solution, peuvent influencer la bioaccumulation chez les organismes aquatiques (Nakamura et al., 2008). Ainsi, une étude menée en laboratoire avec des poissons médaka a démontrée qu'une plus grande concentration de fluoxétine était bioaccumulée lorsque le pH du milieu d'exposition était augmenté de 7 à 9 (Nakamura et al., 2008). Au cours de ces mêmes travaux, d'autres résultats ont démontrés qu'une plus faible concentration de fluoxétine dans le milieu favorisait davantage son métabolisme en métabolite norfluoxétine (Nakamura et al., 2008). De façon similaire aux boues d'épuration et aux sédiments, les antidépresseurs semblent démontrer une assez grande affinité pour certains tissus biologiques comme le cerveau où des récepteurs spécifiques les captent avant d'induire des effets pharmacologiques indésirables sur les espèces intoxiquées (Schultz et al., 2011).

### **1.5. Effets des antidépresseurs sur certains organismes aquatiques**

L'exposition des organismes aquatiques aux rejets urbains suscite de plus en plus d'inquiétude auprès de la communauté scientifique. Le déversement continu de résidus pharmaceutiques augmente la biodisponibilité de ces contaminants pour le biote vivant en permanence dans les eaux réceptrices. À ce jour, peu d'études éco-toxicologiques touchant les antidépresseurs sont disponibles dans la littérature. Toutefois, les récents avancements technologiques en chimie analytique ont permis de confirmer la bioaccumulation d'antidépresseurs dans les tissus de nombreuses variétés de poissons (Brooks et al., 2005; Ramirez et al., 2007; Schultz et al., 2011), de ce fait renforçant le lien entre la présence et les effets toxicologiques potentiels induits par ces substances.

Puisque les antidépresseurs influencent le niveau de sérotonine chez l'humain, la présence de récepteurs sérotoninergiques similaires à l'intérieur de nombreux organismes aquatiques rendent possible certains effets pharmacologiques tels que le dérèglement de l'homéostasie hormonale, de la neurotransmission et l'altération du système immunitaire (van der Ven et al., 2005). Par définition, la toxicité d'une substance est quantifiée par l'utilisation de seuils limites tels que la concentration effective à 50% ( $EC_{50}$ ) ou la plus petite concentration ayant un effet observable (LOEC). La  $EC_{50}$  représente la concentration d'une substance ayant un effet donné sur 50% des individus de l'espèce testée pour un temps d'exposition défini. Plus spécifiquement, la toxicité aigüe est mesurée par la concentration (ou dose) létale à 50% ( $LC_{50}$ ) qui est en fait une  $EC_{50}$  ou l'effet étudié est la mortalité (Cunningham et al., 2006; Rand, 1995). Les tests de toxicité aigüe sont réalisés sur une courte période de temps alors que les tests d'exposition chronique étudient d'autres effets sur l'espèce (croissance de la population, reproduction) sur une plus longue étendue de temps (Rand, 1995).



Une investigation de toxicité chronique et aigüe menée par Henry et ses collaborateurs sur une espèce de zooplancton (*Ceriodaphnia dubia*) a confirmé l'altération du patron de reproduction de cet invertébré lors d'une exposition aux antidépresseurs SSRIs (Henry et al., 2004). Dans cette étude, la présence d'antidépresseurs a réduit considérablement le nombre de nouveau-nés ou « néonates » par femelle lorsque ces organismes ont été exposés à la sertraline à une concentration LOEC de  $45 \mu\text{g L}^{-1}$  (**Tableau 1-1**). Plusieurs antidépresseurs SSRIs ont également démontré des effets directs sur la croissance des gonades, l'induction d'accouchement, la métamorphose et la ponte chez de nombreux organismes aquatiques (Fent, Weston et Caminada, 2006; Calisto et Esteves, 2009). Ainsi, des concentrations de fluvoxamine aussi basses que  $32 \text{ ng L}^{-1}$  ont provoqué l'induction de la ponte chez les mâles de moules zébrés (*Dreissena polymorpha*) (Fong, 1998). D'autres expérimentations complétées avec des moules d'eau douce ont permis de démontrer des effets sérotoninergiques sur les différents stades critiques du développement lors de la reproduction (Gagné et Blaise, 2003). Chez les vertébrés, les antidépresseurs possèdent les habiletés d'altérer le niveau vital de sérotonine endogène qui influence la physiologie de reproduction, l'énergie de métabolisme, le taux hormonal neuroendocrinien impliqué dans le métabolisme du stade de stéroïde-genèse et de spermatogénèse (Mennigen et al., 2010a,b).

Même si les effets de toxicité aigüe sur des organismes aquatiques par exposition réelle aux résidus antidépresseurs sont peu probables, les effets de toxicité chroniques quant à eux demeurent possibles. En dépit des concentrations environnementales peu élevées souvent inférieures aux concentrations requises pour générer de la toxicité, les organismes aquatiques subissent sans relâche des expositions complexes à de multiples classes d'antidépresseurs causant des effets additifs dommageables à plus long terme (Henry et Black, 2007). Le pH du milieu aquatique devient également un paramètre pouvant affecter le niveau de toxicité des antidépresseurs. Tel que rapporté par Nakamura et ses collaborateurs lors d'un test de toxicité aigüe avec des poissons médaka (**Tableau 1-1**), lorsque l'eau est davantage basique à pH 9, la fluoxétine majoritairement sous sa forme non

ionisée présente une valeur de  $LC_{50}$  près de 28 fois moins élevée qu'à pH 7 (Nakamura et al., 2008).

Tout comme plusieurs produits pharmaceutiques, les antidépresseurs se présentent quelques fois sous des formes chirales avec des énantiomères pouvant remarquablement différer dans leur devenir environnemental, leur biodisponibilité et leur toxicité (Paus et al., 2004; Barclay et al., 2012). Ainsi, une étude complétée par Stanley et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence une toxicité plus prononcée pour la *S*-fluoxétine en comparaison à sa molécule énantiomère, *R*-fluoxétine (Stanley et al., 2007). À partir de poissons menés à tête-de-boule (*P. promelas*), des valeurs de toxicité chronique LOEC de  $101 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $170 \mu\text{g L}^{-1}$  ont été obtenus respectivement pour la *S*-fluoxétine et la *R*-fluoxétine lors d'un test de survie (**Tableau 1-1**).

**Tableau 1-1.** Données de toxicité aigüe et chronique sélectionnées dans la littérature impliquant une exposition aux antidépresseurs SSRIs.

Antidépresseurs	Espèces testées	Test toxicité aigüe	Données toxicité aigüe	Données toxicité chronique	Références
Fluoxétine	<i>P. subcapitata</i> (algues bleues)	EC <sub>50</sub> (24h)	24 µg L <sup>-1</sup>	-----	Brooks et al., 2003
	<i>C. dubia</i> (invertébrés – zooplancton)	EC <sub>50</sub> (24h)	234 µg L <sup>-1</sup>	-----	Brooks et al., 2003
	<i>C. dubia</i> (invertébrés – zooplancton)	LC <sub>50</sub> (48h)	0.51 ± 0.07 mg L <sup>-1</sup>	0.089 mg L <sup>-1</sup> (NOEC)	Henry et al., 2004
	<i>O. latipes</i> (vertébrés – poisson medaka)	LC <sub>50</sub> (96h)	5.5 mg L <sup>-1</sup> , pH = 7 1.3 mg L <sup>-1</sup> , pH = 8 0.2 mg L <sup>-1</sup> , pH = 9		Nakamura et al., 2008
R-Fluoxétine	<i>P. promelas</i> (vertébrés – poissons tête-de-boule)	LC <sub>50</sub> (48h)	212 µg L <sup>-1</sup>	170 µg L <sup>-1</sup> (LOEC), Test survie	Stanley et al., 2007
S-Fluoxétine	<i>P. promelas</i> (vertébrés – poissons tête-de-boule)	LC <sub>50</sub> (48h)	216 µg L <sup>-1</sup>	101 µg L <sup>-1</sup> (LOEC), Test survie	Stanley et al., 2007
Paroxétine	<i>C. dubia</i> (invertébrés – zooplancton)	LC <sub>50</sub> (48h)	0.58 ± 0.13 mg L <sup>-1</sup>	-----	Henry et al., 2004
Citalopram	<i>C. dubia</i> (invertébrés – zooplancton)	LC <sub>50</sub> (48h)	3.90 ± 0.27 mg L <sup>-1</sup>	4.0 mg L <sup>-1</sup> (LOEC)	Henry et al., 2004
Fluvoxamine	<i>C. dubia</i> (invertébrés – zooplancton)	LC <sub>50</sub> (48h)	0.84 ± 0.41 mg L <sup>-1</sup>	0.366 mg L <sup>-1</sup> (NOEC)	Henry et al., 2004
	<i>P. subcapitata</i> (algues bleues)	IC <sub>50</sub> (96h)	4003 ± 143 µg L <sup>-1</sup>	-----	Johnson et al., 2007
Sertraline	<i>P. subcapitata</i> (algues bleues)	IC <sub>50</sub> (96h)	12.1 ± 1.0 µg L <sup>-1</sup>	-----	Johnson et al., 2007
	<i>C. dubia</i> (invertébrés – zooplancton)	LC <sub>50</sub> (48h)	0.12 ± 0.05 mg L <sup>-1</sup>	0.045 mg L <sup>-1</sup> (LOEC)	Henry et al., 2004

IC<sub>50</sub> : Concentration nécessaire pour inhiber 50% de la croissance des algues bleues; NOEC : Plus basse concentration où aucun effet n'est observé; LOEC : Plus basse concentration observée ayant un effet.

## **1.6. Préparation des échantillons environnementaux**

### **1.6.1. Eaux usées (affluents, effluents)**

Tel que rapporté par plusieurs groupes de recherche (Metcalfé et al., 2010; Langford et Thomas, 2009; Vasskog et al., 2006), et conformément aux travaux réalisés dans nos laboratoires (Lajeunesse et al., 2012; Lajeunesse, Gagnon et Sauvé, 2008), l'échantillonnage d'eaux usées s'est effectué directement sur les sites de stations d'épuration à l'aide d'échantillonneurs automatisés à débit proportionnel sur une période de 24-h. Les échantillons recueillis ont été transvidés dans des bouteilles de polyéthylène sans agent de conservation, expédiés au laboratoire dans une glacière à 4°C, puis filtrés à l'aide de filtre en fibre de verre 0.7µm. Malgré une stabilité relative prouvée des antidépresseurs sur 7 jours à la noirceur à 4°C (Lajeunesse, Gagnon et Sauvé, 2008), tous les échantillons ont été extraits dans un délai de 48-h. Sinon, ils ont été congelés à -20°C jusqu'à leur extraction subséquente.

### **1.6.2. Boues de traitement**

Les échantillons de boues de traitement (i.e. biosolides) ayant été prélevés représentent les résidus solides issus des différents traitements dans les stations d'épuration. Les boues traitées ont été échantillonnées manuellement après digestion anaérobie ou aérobie (temps de rétention : 15 à 20 jours) à la sortie de réacteurs dans des contenants de polyéthylène maintenus à 4°C dans une glacière. Dès l'arrivée au laboratoire, environs 10 g de boues humides ont été gelés, puis lyophilisés pendant 2 jours pour obtenir des échantillons secs. Étant donné la grande activité bactérienne présente dans les boues traitées, les échantillons finaux ont été entreposés à -80°C jusqu'à leur extraction en laboratoire (Lajeunesse et al., 2012).

### 1.6.3. Tissus biologiques

Dans le cadre d'une expérimentation menée à la station d'épuration de la ville de Montréal, des spécimens de truites mouchetées juvéniles ont été exposées en mésocosmes pendant 3 mois à différentes concentrations d'effluent dilué. Suivant l'exposition, des poissons vivants sacrifiés ont été rapidement apportés dans une glacière à 4°C au laboratoire pour fin de dissection. Les tissus prélevés (i.e. foie, cerveaux, muscle ou filet) ont été broyés et dilués sous forme d'homogénats par l'ajout d'une solution tampon HEPES-NaOH 10 mM (pH 7.4) selon le protocole développé par notre groupe de recherche (Lajeunesse et al., 2011). Des aliquots finaux contenant 100 mg de tissus dans 1 mL de solution tampon ont été préparés dans des contenants Eppendorf™ coniques en polypropylène avant d'être congelés à -80°C.

### 1.7. Instrumentation

Cette section décrit brièvement les principaux instruments utilisés en laboratoire pour les expérimentations menant à la détection, quantification et confirmation des résidus antidépresseurs dans diverses matrices environnementales. Tel qu'indiqué dans le titre de cette thèse, l'utilisation d'un chromatographe en phase liquide à haute performance « *high pressure liquid chromatography* » (HPLC) couplé à un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) a permis la réalisation de l'ensemble des analyses. Il importe donc de bien définir dans les prochaines sous-sections le fonctionnement et le rôle des différentes parties intégrantes de ces instruments de haute technologie.

### 1.7.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance, souvent appelée HPLC, constitue une technique séparative à l'échelle analytique très générale d'emploi où pratiquement la seule obligation pour l'échantillon est d'être soluble dans une phase mobile (Rouessac et Rouessac, 1995). Le HPLC qui précède physiquement le détecteur (i.e. le spectromètre de masse) permet de purifier des extraits liquides en séparant sous haute pression des analytes selon leur affinité pour une phase stationnaire (colonne remplie de résines sphériques de quelques  $\mu\text{m}$ ), ou une phase mobile d'entraînement (mélange de solvants en proportion variable). Le processus de séparation fait intervenir des mécanismes d'échange analyte / phase mobile / phase stationnaire basés sur les coefficients d'absorption ou de partage selon la nature du remplissage de la colonne chromatographique (Rouessac et Rouessac, 1995).

Lorsqu'un HPLC est couplé à un spectromètre de masse, le choix de phase mobile devient limité. Ainsi, pour des raisons de compatibilité à l'interface des deux instruments pendant l'étape d'ionisation des analytes, l'utilisation de la chromatographie en phase inversée est fortement recommandée. Ce mode de séparation implique à la fois une phase stationnaire de nature non-polaire conçue à partir de greffons de carbone attachés à un support de silice (ex. octadécylsilane, C18), et une phase mobile polaire composée d'un solvant organique (acétonitrile, méthanol) et/ou d'une solution aqueuses sans additif, faiblement acidifiée (acide formique, acide acétique 0.1 – 0.01% v/v) ou faiblement tamponnée (formate d'ammonium, acétate d'ammonium, bicarbonate d'ammonium 5 – 10 mM). Pour les travaux touchant les antidépresseurs, la composition de la phase mobile s'avère cruciale pour assurer une bonne séparation des composés, mais surtout pour obtenir de bonnes limites de détection (LOD) avec le spectromètre de masse. En employant un mélange de solvants de composition constante, quelques fois il n'est pas toujours possible d'obtenir une séparation satisfaisante dans un délai raisonnable (Rouessac et Rouessac,

1995). Toutefois, à partir de pompes calibrées et de programmes automatisés, les HPLC peuvent améliorer considérablement la séparation en augmentant de façon graduelle le pourcentage de solvant ayant la polarité ou la force d'élution la plus élevée (Chavanne et al., 1986).

### **1.7.2. Spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS**

L'objectif principal de la spectrométrie de masse (MS) est de générer et séparer aux analyseurs des ions à partir de composés organiques ou inorganiques, mais également de les détecter de façon qualitative et quantitative par leur rapport  $m/z$  et leur abondance relative (Gross, 2004). La spectrométrie de masse en tandem, ayant pour acronyme MS/MS, représente quant à elle toute méthode générale qui implique au moins deux étapes de séparation de masses entre lesquelles il y a processus de dissociation ou réaction chimique menant au changement de la masse ou de la charge d'un ion (de Hoffmann et Stroobant, 2005; McLafferty, 1981).

Pendant une expérience MS/MS, un premier analyseur sert à isoler un ion précurseur qui subit ensuite une fragmentation (spontanée ou par activation) avant de donner des ions produits et des fragments neutres. Par la suite, un second analyseur sépare les ions produits (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Dans la littérature scientifique, la configuration QqQ indique un instrument avec trois analyseurs dont deux quadripôles (Q1 et Q3) et un hexapôle ou quadripôle (q) installé à l'intérieur d'une cellule de collision (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Des instruments à temps de vol « Time-of-flight » (ToF) avec quadripôle (Q1), hexapôle (q) et réflectron permettent aussi des analyses en tandem (QqToF). Cependant, malgré l'indéniable spécificité apportée par l'analyse MS/MS, ce type d'instrument trouve surtout son utilité dans la mesure de masses exactes lors de caractérisation et confirmation de structures moléculaires grâce à sa haute résolution.

### 1.7.3. Couplage chromatographie – spectrométrie de masse

Pour améliorer l'analyse d'un mélange complexe (ex. extrait d'une eau brute de station d'épuration), on couple habituellement au spectromètre de masse une méthode séparative telle que la chromatographie en phase liquide (LC), gazeuse (GC) ou l'électrophorèse capillaire (CE). Toutefois, dans le cas de LC-MS et CE-MS, les produits séparés doivent être introduits successivement dans le spectromètre sous forme gazeuse ionisée, exempt de solvant (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Cette problématique rencontrée mène nécessairement au développement de nouvelles technologies éprouvées et performantes pour ces instruments permettant entre autre la formation de fines gouttelettes par nébulisation dans une source à pression atmosphérique avec ionisation des molécules avant leur entrée dans le spectromètre de masse opéré sous un vide appréciable ( $10^{-3} - 10^{-7}$  mbar). Dans ce processus, l'évaporation progressive du solvant dans les gouttelettes (débit de l'ordre du  $\text{mL min}^{-1}$ ) provoque un rétrissement de ces dernières et l'augmentation de leur densité de charge induite soit par une différence de potentiel ou une décharge électrique. Par la suite, ce rétrissement se poursuit jusqu'au moment où les forces coulombiennes répulsives approchent celles de cohésions des gouttelettes (limite de Rayleigh), provoquant ainsi l'explosion des dernières gouttelettes de solvant et la libération des molécules ionisées en vapeur qui seront dirigées de la source vers l'intérieur du spectromètre de masse (de Hoffmann et Stroobant, 2005; Gross, 2004).

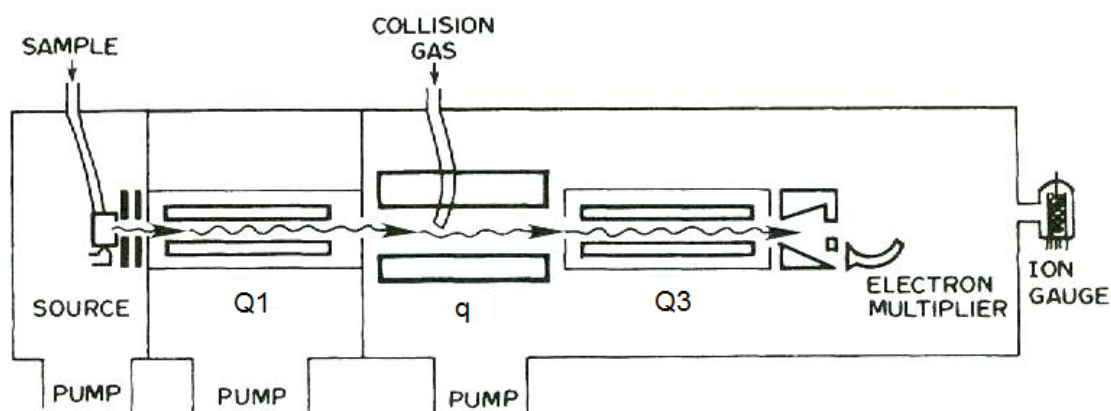
Actuellement, différentes sources sont utilisées pour les instruments de configuration LC-MS. Mentionnons entre autre une série de techniques pneumatiques associées à la nébulisation thermique « *thermospray* » (TSP), la nébulisation électrostatique « *electrospray* » (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique avec décharge Corona (APCI) et la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). Toutefois, malgré d'importantes percées technologiques accomplies jusqu'ici dans le domaine, mentionnons



la vulnérabilité observée de ces techniques face aux effets de matrice « *matrix effects* » où des pertes de sensibilité instrumentale sont fréquemment observées (Barron et al., 2008).

#### 1.7.4. Techniques d'analyse par triple quadripôle (QqQMS)

L'instrument triple quadripôle provient de la combinaison de deux analyseurs quadripolaires en série, séparé par une cellule de collision, constituée soit d'un analyseur quadripolaire ou hexapolaire. Cette configuration de quadripôle permet de travailler en mode MS simple ou en MS/MS. Pour réaliser une acquisition en mode de balayage (MS), il suffit de ne pas appliquer de voltage aux plaques d'accélération et ne pas activer l'analyseur q de la cellule centrale de collision. Par contre, lors d'une acquisition MS/MS, la cellule de collision q est alimentée avec de l'azote de haute qualité (pureté  $\geq 99.9999\%$ ) sous une pression relativement élevée (Gros, 2004). L'énergie cinétique de l'ion isolé par Q1 est convertie en énergie interne par des collisions multiples dans la cellule de collision. Lorsque l'énergie emmagasinée dépasse celle de la barrière d'activation, l'ion se dissocie en fragments. Cette technique dite de dissociation activée par collision peut être amplifiée en augmentant l'énergie cinétique des ions isolés par l'élévation d'un voltage entre la source et la cellule de collision (Gros, 2004). En général, les analyses MS/MS peuvent être faites selon quatre modes différents : le balayage d'ions produits « *product ion scan* », le balayage d'ion précurseur « *precursor ion scan* », le balayage avec perte de neutre « *neutral loss scan* » et la détection de réaction sélectionnée « *selected reaction monitoring* » ou SRM (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Ce dernier mode évoqué est de loin celui le plus utilisé pour la quantification d'analytes puisqu'il permet une double spécificité par l'isolation sélective de l'ion précurseur et l'ion fragment sélectionné. De fait, l'importante diminution de bruit de fond (rapport signal sur le bruit de fond, *S/N*) contribue grandement à la sensibilité de l'instrument QqQMS. Un schéma des principales parties d'un analyseur QqQMS est présenté dans la **Figure 1.8**.



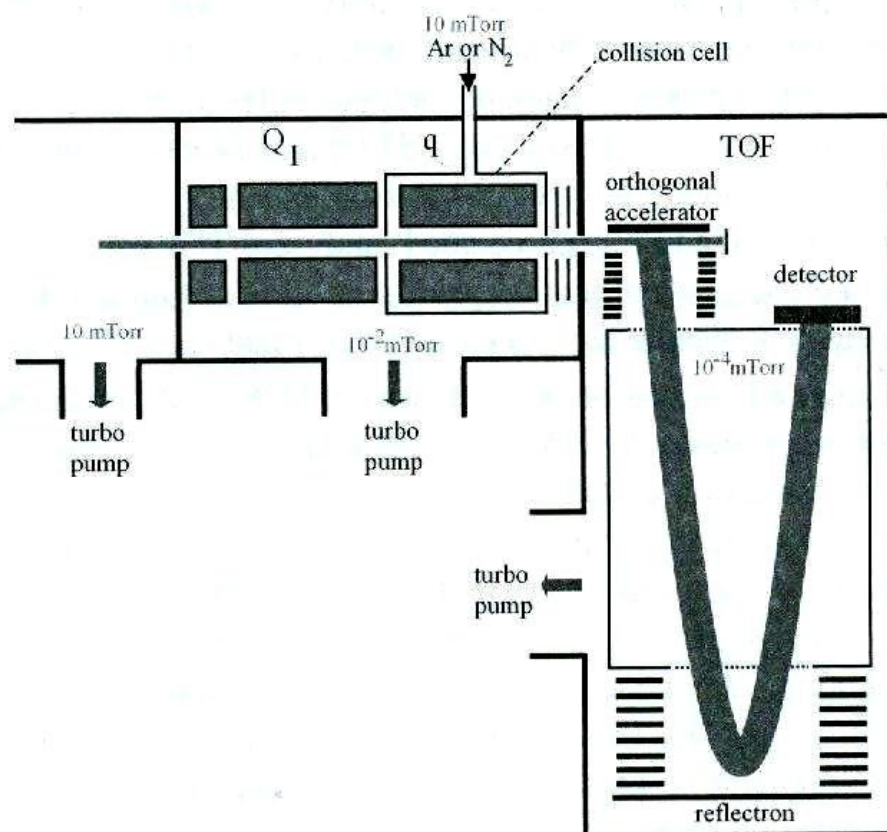
**Figure 1.8.** Schéma des principales parties d'un analyseur QqQMS (Gros, 2004).

Avec l'analyseur QqQMS, la gamme de masse maximum pouvant être atteinte est de 4000 unité de masse atomique (u.m.a.), et la résolution de l'ordre de 3000. Habituellement, on admet que deux pics sont résolus quand l'intensité de la vallée entre ces pics égale 10% de l'intensité du pic le plus faible (i.e. résolution à 10%). Si  $\delta m$  est la plus petite différence de masse pour deux pics résolus de masse  $m$  et  $m + \delta m$ , on définit la résolution  $R$  par  $R = m / \delta m$  (de Hoffmann et Stroobant, 2005). En pratique, avec un instrument QqQMS la résolution qu'on peut atteindre n'est jamais suffisante pour déduire une analyse élémentaire, de sorte que l'on travaille habituellement à « résolution unitaire », c.-à-d. en séparant les ions qui diffèrent d'une unité de masse (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Ces analyseurs ne permettent donc pas d'obtenir des résolutions suffisantes pour confirmer des structures moléculaires. Les spectromètres de ce type sont considérés comme des appareils à basse résolution.

### 1.7.5. Analyseur temps de vol (QqToFMS)

Le schéma d'un analyseur à temps de vol (ToF) est illustré à la Figure 1.9. L'analyseur ToF sépare les ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans une zone libre de champ appelé tube de vol. Ainsi, les ions provenant d'une source ESI, APCI ou APPI sont expulsés de la source par paquets lorsqu'ils sont propulsés par une application très brève des potentiels voulus sur les électrodes de focalisation de la source (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Ces ions sont accélérés vers le tube de vol grâce à une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction. Comme tous les ions acquièrent la même énergie cinétique, des ions caractérisés par une distribution de leur masse présentent aussi une distribution de leur vitesse. Avec un spectromètre ToF, les rapports  $m/z$  sont déterminés en mesurant le temps nécessaire aux divers ions pour parcourir d'un mouvement rectiligne uniforme la distance de vol correspondant à la distance dans la région libre de champ entre la zone d'accélération et le détecteur (de Hoffmann et Stroobant, 2005). A titre d'informations, le domaine de masse d'un instrument ToF n'a pas de limite supérieure et la vitesse d'analyse de ces analyseurs est très rapide (elle peut atteindre 1000 unités de masse par  $\mu\text{sec}$ ). Il est donc possible de produire plusieurs milliers de spectres de masse ToF par sec sur une très large gamme de masse. Cependant, l'inconvénient le plus important retrouvé chez ce type d'analyseur est lié à la perte de résolution des masses causée par des sources de dispersion des temps de vol pour les ions possédant le même rapport  $m/z$ . Ainsi, trois sources de dispersion des temps de vol sont fréquemment retrouvées : La distribution temporelle induite par la durée de l'impulsion de formation des ions, la distribution spatiale des ions induite par la taille du volume dans lequel les ions sont formés et la distribution en énergie cinétique induite par la variation de la vitesse initiale des ions lors de leur formation (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Afin d'améliorer ces pertes connues de dispersion, les nouveaux analyseurs ToF procèdent maintenant à une extraction retardée des ions avec un dispositif de pulses directement dans la source. Aussi, l'incorporation d'une composante optique avancée telle que le réflectron permet une nette amélioration de la résolution des masses. Finalement, la

configuration physique de l'instrument avec injection perpendiculaire ou orthogonale contribue également à une diminution des dispersions indésirables. Ainsi, avec ces nouvelles technologies implantées les nouvelles générations d'analyseur QqToF peuvent maintenant atteindre des résolutions  $> 10\,000$  (de Hoffmann et Stroobant, 2005). Ces analyseurs produisant des analyses hautes résolution sont couramment utilisés pour la caractérisation ou la confirmation de nouvelles entités chimiques. Un schéma des principales parties d'un analyseur QqToFMS avec injection orthogonale est présenté dans la **Figure 1.9**.



**Figure 1.9.** Schéma des principales parties d'un analyseur QqToFMS (de Hoffmann et Stroobant, 2005).

## **1.8. Méthodes d'analyses des antidépresseurs**

Jusqu'à présent, des percées majeures ont été réalisées en matière de développement analytique pour la quantification des antidépresseurs présents à l'état de traces dans les matrices environnementales. Dépendamment du budget disponible, de la complexité des échantillons et de la sensibilité exigée, le choix des scientifiques peut varier passablement lors de l'élaboration d'une nouvelle méthode en laboratoire. Néanmoins, parmi les technologies couramment utilisées figurent les instruments GC-MS, LC-MS et LC-MS/MS. Malgré une spécificité et une souplesse d'utilisation remarquable, ces instruments requièrent une purification adéquate des échantillons riches en impuretés (matières organiques et inorganiques) pour en diminuer les interférences ou effets de matrice qui modifient l'intensité des signaux obtenus (Debska, Kot-Wasik et Namieśnik, 2004 ; Gros, Petrović et Barceló, 2006; Kot-Wasik, Debska et Namieśnik, 2007). D'ailleurs, le processus d'ionisation par nébuliseur électrostatique positif ou négatif (ESI+, ESI-) retrouvé aux interfaces des instruments LC-MS et LC-MS/MS est associé à certains effets de matrice parfois rencontrés pendant ce type d'analyse (Gros, Petrović et Barceló, 2006).

### **1.8.1. Premières méthodes, études médicales et médico-légales**

Avant l'avènement des analyses environnementales, quelques méthodes analytiques pour la détection des antidépresseurs à l'intérieur de matrices biologiques ont attiré l'attention dans le domaine médical et médico-légal (Wille et al., 2005; Salgado-Petinal et al., 2005). La première méthode a permis l'extraction sélective de 13 antidépresseurs dans le plasma humain et leurs analyses subséquentes par GC-MS (Wille et al., 2005). Historiquement, cette méthode comportant deux étapes de purification dont une extraction sur phase solide (SPE) avec résines échangeuses de cations et une extraction liquide-liquide (LLE) a été la première à permettre l'extraction simultanée de nombreux antidépresseurs issus de classes variées. Malheureusement, en dépit des taux de recouvrement intéressants

ayant été rapportés (70-109%), l'étendue des concentrations avoisinant les  $\mu\text{g L}^{-1}$  ne permet pas l'analyse de résidus antidépresseurs dans les matrices environnementales où des concentrations de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  sont plutôt détectées. La seconde méthode rapportée par Salgado-Petinal et son équipe (Salgado-Petinal et al., 2005) a été développée pour l'extraction de 3 antidépresseurs (fluoxétine, fluvoxamine, sertraline) dans l'urine par micro-extraction sur film de divinylbenzène poly-diméthyle siloxane (PDMS-DVB). L'analyse des extraits par GC-MS avec trappe ionique en mode de balayage des masses ou « *scan* » a révélé une limite de détection (LOD) moyenne plutôt élevée ( $235 \text{ ng L}^{-1}$ ) pour l'ensemble des antidépresseurs étudiés.

### 1.8.2. Méthodes environnementales

La première méthode capable de quantifier des traces d'antidépresseurs à des concentrations inférieures à  $100 \text{ ng L}^{-1}$  dans les eaux environnementales a été publiée par Vasskog et son équipe (Vasskog et al., 2006). Ils ont détectés 5 antidépresseurs (sertraline, fluoxétine, paroxétine, citalopram, fluvoxamine) dans l'eau d'égout d'un hôpital psychiatrique de Tromsø en Norvège en utilisant un LC-(ESI)-MS/MS. Les auteurs ont utilisé deux méthodes de purification différentes (SPE, LLE) afin de diminuer les importants effets de matrice générés par un volume d'eaux usées initial de 2.5 L. La limite de quantification (LOQ) de leur méthode s'étendait entre 0.12 et  $0.29 \text{ ng L}^{-1}$  (Vasskog et al., 2006). Cette même année, Gros et ses collaborateurs ont publié une méthode multi-composés LC-(ESI)-MS/MS avec analyseur triple quadripôle permettant l'analyse de 29 drogues provenant de 7 familles pharmaceutiques différentes dans l'eau de surface et l'eau usée (Gros, Petrović et Barceló, 2006). Parmi les antidépresseurs sélectionnés, la fluoxétine et la paroxétine ont été extraits à l'aide de cartouches polymériques avec résine divinylbenzène *N*-vinylpyrrolidone à des taux de récupération variant entre 60 et 108%. La méthode développée démontrait des LOQ élevées ( $20 - 100 \text{ ng L}^{-1}$ ) et de longs temps de

rétenion ( $t_r > 20$  min.) pour l'élution des antidépresseurs sur colonne chromatographique en phase inversée C18.

En 2007, Chu et Metcalfe ont proposé une méthode analytique alternative pour minimiser les effets de matrice suite à l'extraction par liquide pressurisé et SPE d'antidépresseurs (paroxétine, fluoxétine et norfluoxétine) contenus dans la chair de 3 espèces de poisson (Chu et Metcalfe, 2007). L'analyse par LC-MS/MS avec ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) a permis de réduire substantiellement les effets de matrice tout en procurant des valeurs convenables de LOQ ( $0.07 - 0.24 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Récemment, Schultz et Furlong ont développé une méthode LC-(ESI)-MS/MS quantitative pour la détermination de 8 antidépresseurs et 2 de leurs métabolites à partir d'échantillons environnementaux d'eaux usées et d'eaux de surface aux États-Unis (Schultz et Furlong, 2008). Les chercheurs ont obtenus des taux de récupération de 33-115% dans les effluents et de 12-118% dans les affluents. La valeur moyenne de LOD déterminées dans l'eau souterraine s'élevait à  $0.28 \text{ ng L}^{-1}$ .

Finalement, une autre méthode analytique publiée par Togola et Budzinski a permis la détection de plusieurs produits pharmaceutiques incluant 2 antidépresseurs (amitriptyline et imipramine) dans une variété d'eaux (usée, surface et consommation) par GC-MS avec analyseur triple quadripôle en mode de détection d'ions sélectionnés (SIM) (Togola et Budzinski, 2008). La méthode renfermant une étape de purification par SPE avec cartouches en mode mixte (résine combinée polymérique - échangeuse de cations) s'est révélée excellente en terme de sélectivité pour extraire simultanément des composés à caractère acide, basique et neutre. Néanmoins, malgré sa simplicité, cette méthode a démontré une certaine limitation quant à sa sensibilité envers les échantillons plus complexes en présentant de hautes valeurs LOD (amitriptyline :  $6.8 \text{ ng L}^{-1}$ , imipramine :  $12.7 \text{ ng L}^{-1}$ ). D'autres méthodes analytiques développées pour la détection et quantification

des antidépresseurs à l'intérieur de matrices environnementales variées sont présentées au **Tableau 1-2**.

Les études rapportées dans cette section ont servi de point de référence pour le développement de nouvelles méthodes analytiques sensibles et spécifiques, mieux adaptées aux exigences des différents travaux de recherche complétés au cours de cette thèse. Ainsi, de nombreux efforts ont été consacrés à la purification d'échantillons d'eaux usées avec cartouches par SPE pour tenter de diminuer au maximum les effets de matrice rencontrés pendant les analyses LC-MS/MS. Aussi, une attention particulière a été portée à la composition des phases mobiles utilisées pour diminuer le seuil de détection des antidépresseurs. Désormais, moins d'échantillon est requis pour compléter une analyse de tissus biologiques où la quantité initiale disponible est souvent limitée. Finalement, l'utilisation d'une plus petite quantité d'échantillon a permis par ricochet de diminuer le temps d'extraction en laboratoire.



**Tableau 1-2.** Méthodes analytiques optimisées impliquant la détermination d'antidépresseurs dans divers échantillons environnementaux.

Antidépresseurs	Méthode	Échantillon	Purification échantillon	Performances	Références
Fluoxétine	LC-(ESI)-MS/MS	A, E	SPE (Bond Elut ENV), LLE	Récup. E : 64-92%, LOQ E : 0.12 ng L <sup>-1</sup>	Vasskog et al., 2006
	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 60-108%, LOQ A, E : 70, 100 ng L <sup>-1</sup>	Gros et al., 2006
	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 102-110%, ES : 117%, LOD ESO : 0.25 ng L <sup>-1</sup>	Schultz et Furlong, 2008
	LC-(APCI)-MS/MS	TP	PLE, SPE (Oasis MCX)	Récup. TP : 96.2%, LOQ TP : 0.07 ng g <sup>-1</sup>	Chu et Metcalfe, 2007
	GC-MS	ES, E	SPME (DVB-PDMS)	Récup. ES, E : 100%, 103%, LOD eau purifiée : 17 ng L <sup>-1</sup>	Lamas et al., 2004
	CE-(ESI)-TOFMS	ES	SPE H <sub>2</sub> O-philic DVB	Récup. eau purifiée : 95%, LOD eau purifiée, ES : 16, 49 µg L <sup>-1</sup>	Himmelsbach et al., 2006
	LC-(ESI)-MS	ES, ESO	SPE (Oasis HLB)	Récup. ES : 78%, LOD ES : 18 ng L <sup>-1</sup>	Cahill et al., 2004
	LC-(ESI)-MS/MS	BT	PLE, SPE (Oasis HLB)	Récup. BT primaire: 80.2%, LOD BT primaire : 1.2 ng g <sup>-1</sup>	Radjenović et al., 2009
	GC-MS	TP	LLE, SPE (Bond Elute Certify)	Récup. TP : 81-107%, LOQ TP : 0.05 ng g <sup>-1</sup>	Brooks et al., 2005
Norfluoxétine	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 12-61%, ES : 98%, LOD ESO : 0.28 ng L <sup>-1</sup>	Schultz et Furlong, 2008
	LC-(APCI)-MS/MS	TP	PLE, SPE (Oasis MCX)	Récup. TP : 85.6%, LOQ TP : 0.14 ng g <sup>-1</sup>	Chu et Metcalfe, 2007
	GC-MS	TP	LLE, SPE (Bond Elute Certify)	Récup. TP : 60-70%, LOQ TP : 0.05 ng g <sup>-1</sup>	Brooks et al., 2005

**Tableau 1-2 (suite).** Méthodes analytiques optimisées impliquant la détermination d'antidépresseurs dans divers échantillons environnementaux.

Antidépresseurs	Méthode	Échantillon	Purification échantillon	Performances	Références
Paroxétine	LC-(ESI)-MS/MS	A, E	SPE (Bond Elut ENV), LLE	Récup. E : 71-92%, LOQ E : 0.12 ng L <sup>-1</sup>	Vasskog et al., 2006
	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. E, A : 65-96%, LOQ E, A : 26, 22 ng L <sup>-1</sup>	Gros et al., 2006
	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 87-95%, ES : 111%, LOD ESO : 0.32 ng L <sup>-1</sup>	Schultz et Furlong, 2008
	LC-(APCI)-MS/MS	TP	PLE, SPE (Oasis MCX)	Récup. TP : 99.2%, LOQ 0.24 ng g <sup>-1</sup>	Chu et Metcalfe, 2007
	CE-(ESI)-TOFMS	ES	SPE H <sub>2</sub> O-philic DVB	Récup. eau purifiée : 93%, LOD eau purifiée, ES : 31, 43 µg L <sup>-1</sup>	Himmelsbach et al., 2006
	LC-(ESI)-MS/MS	BT	PLE, SPE (Oasis HLB)	Récup. BT primaire: 53.7%, LOD BT primaire : 0.66 ng g <sup>-1</sup>	Radjenović et al., 2009
Citalopram	LC-(ESI)-MS/MS	A, E	SPE (Bond Elut ENV), LLE	Récup. E : 36-72%, LOQ E : 0.16 ng L <sup>-1</sup>	Vasskog et al., 2006
	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 82-86%, ES : 105%, LOD ESO : 0.45 ng L <sup>-1</sup>	Schultz et Furlong, 2008
	GC-MS	ES, E	SPME (DVB-PDMS)	Récup. ES, E : 105%, 102%, LOD eau purifiée : 15 ng L <sup>-1</sup>	Lamas et al., 2004
	CE-(ESI)-TOFMS	ES	SPE H <sub>2</sub> O-philic DVB	Récup. eau purifiée : 94%, LOD eau purifiée, ES : 9, 18 µg L <sup>-1</sup>	Himmelsbach et al., 2006
Fluvoxamine	LC-(ESI)-MS/MS	A, E	SPE (Bond Elut ENV), LLE	Récup. E : 56-82%, LOQ E : 0.15 ng L <sup>-1</sup>	Vasskog et al., 2006
	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 89-100%, ES : 89%, LOD ESO : 0.24 ng L <sup>-1</sup>	Schultz et Furlong, 2008
	GC-MS	ES, E	SPME (DVB-PDMS)	Récup. ES, E : 105%, 102%, LOD eau purifiée : 75 ng L <sup>-1</sup>	Lamas et al., 2004

**Tableau 1-2 (suite).** Méthodes analytiques optimisées impliquant la détermination d'antidépresseurs dans divers échantillons environnementaux.

Antidépresseurs	Méthode	Échantillon	Purification échantillon	Performances	Références
Sertraline	LC-(ESI)-MS/MS	A, E	SPE (Bond Elut ENV), LLE	Récup. E : 52-85%, LOQ E : 0.29 ng L <sup>-1</sup>	Vasskog et al., 2006
	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 70-113%, ES : 84%, LOD ESO : 0.21 ng L <sup>-1</sup>	Schultz et Furlong, 2008
	GC-MS	ES, E	SPME (DVB-PDMS)	Récup. ES, E : 88%, 98%, LOD eau purifiée : 17 ng L <sup>-1</sup>	Lamas et al., 2004
	CE-(ESI)-TOFMS	ES	SPE H <sub>2</sub> O-philic DVB	Récup. eau purifiée : 95%, LOD eau purifiée, ES : 39, 53 µg L <sup>-1</sup>	Himmelsbach et al., 2006
	GC-MS	TP	LLE, SPE (Bond Elute Certify)	Récup. TP : 67-105%, LOQ TP : 0.05 ng g <sup>-1</sup>	Brooks et al., 2005
Desméthylsertraline	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 33-38%, ES : 98%, LOD ESO : 0.32 ng L <sup>-1</sup>	Schultz et Furlong, 2008
	GC-MS	TP	LLE, SPE (Bond Elute Certify)	Récup. TP : 49-66%, LOQ TP : 0.05 ng g <sup>-1</sup>	Brooks et al., 2005
Venlafaxine	LC-(ESI)-MS/MS	ES, A, E	SPE (Oasis HLB)	Récup. A, E : 113-118%, ES : 108%, LOD ESO : 0.29 ng L <sup>-1</sup>	Schultz et Furlong, 2008
	GC-MS	ES, E	SPME (DVB-PDMS)	Récup. ES, E : 94%, 120%, LOD eau purifiée : 27 ng L <sup>-1</sup>	Lamas et al., 2004
	CE-(ESI)-TOFMS	ES	SPE H <sub>2</sub> O-philic DVB	Récup. eau purifiée : 96%, LOD eau purifiée, ES : 7, 15 µg L <sup>-1</sup>	Himmelsbach et al., 2006
Amitriptyline	GC-MS	ES, EC, E	SPE (Oasis MCX)	Récup. eau purifiée : 95%, LOD EC, ES, E : 0.7, 2.2, 6.8 ng L <sup>-1</sup>	Togola et Budzinski, 2008
Imipramine	GC-MS	ES, EC, E	SPE (Oasis MCX)	Récup. Eau purifiée : 95%, LOD EC, ES, E : 0.7, 1.2, 12.7 ng L <sup>-1</sup>	Togola et Budzinski, 2008

A : Affluent, E : Effluent, ES : Eau de surface, TP : Tissus de poisson, EC : Eau de consommation, ESO : Eau souterraine, BT : Boues de traitement, SPE : Extraction sur phase solide (cartouches), LLE : Extraction liquide-liquide, PLE : Extraction liquide pressurisée, SPME : Micro-extraction sur phase solide, DVB-PDMS : Divinylbenzène polydiméthylsiloxane, CE : Électrophorèse capillaire, TOFMS : Spectromètre de masse avec tube à temps de vol, APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique, Récup. : Récupération.

## 1.9. Perspective de la recherche

Étant donné le niveau peu avancé des connaissances sur le devenir environnemental des antidépresseurs, il a été décidé initialement d'améliorer certaines méthodologies existantes en terme de spécificité et sensibilité afin d'assurer une détection adéquate des composés à la fois dans les eaux usées municipales et les eaux de surface où sont déversés les effluents traités.

Dans un premier temps, des efforts ont été déployés à la purification des échantillons et à l'amélioration du seuil de détectabilité des antidépresseurs. Au début de ce projet de doctorat, peu de méthodes analytiques robustes offraient la capacité d'analyser des extraits complexes d'eaux usées provenant de traitement primaire physico-chimique. Limitées en nombre, ces méthodes préconisaient soit une approche multi-composés non spécifique en balayant un vaste éventail de produits pharmaceutiques, soit une analyse simplifiée en choisissant un nombre restreint d'antidépresseurs. Les objectifs initiaux étaient donc d'inclure dans les études plusieurs classes d'antidépresseurs, d'abaisser au maximum les effets de matrice générés par les extraits, mais également d'augmenter l'intensité des signaux lorsque des analyses par LC-MS/MS sont complétées.

En second lieu, avant d'entreprendre ces travaux de recherche, il y avait peu de méthodes analytiques validées permettant de confirmer la bioaccumulation de résidus d'antidépresseurs dans les tissus d'organismes aquatiques exposés à des effluents municipaux. Les teneurs calculées pour chacun des antidépresseurs ainsi que leur distribution respective dans les différents tissus analysés deviennent très importants lorsque l'on veut clarifier le devenir environnemental de ces substances actives. À ce jour, aucune étude éco-toxicologique pouvant établir une corrélation entre la présence d'un antidépresseur dans un tissu biologique et l'activité spécifique d'un biomarqueur d'exposition n'a été répertoriée dans la littérature. Par conséquent, il a été décidé de s'attarder d'abord au développement d'une méthode analytique sensible permettant

l'analyse d'antidépresseurs dans divers tissus de poisson (foie, cerveau, filet). Par la suite, l'application de cette nouvelle méthode a été mise à profit dans l'élaboration d'un nouveau biomarqueur d'exposition impliqué dans la régulation de la sérotonine dans le cerveau de poisson.

Troisièmement, il a été décidé de s'attarder au devenir environnemental des antidépresseurs lors des traitements dans les stations d'épuration d'eaux usées. Ainsi, divers procédés de traitement ont été investigués afin de déterminer l'efficacité de plusieurs traitements primaires physico-chimiques et secondaires biologiques en terme de taux d'enlèvement de résidus antidépresseurs. Encore une fois, peu d'études publiées sur le sujet sont présentement disponibles. Même constat en ce qui concerne les méthodes analytiques permettant l'analyse d'antidépresseurs dans les échantillons solides de boues de traitement. De ce fait, une partie des énergies a été consacré au développement d'une nouvelle méthode analytique répondant à ces attentes. L'analyse approfondie des échantillons de boues de traitement s'avère essentielle pour mieux comprendre le comportement physico-chimique et les affinités relatives des antidépresseurs pour la phase particulaire.

Finalement, la dernière partie de cette thèse a permis de vérifier l'efficacité d'un traitement avancé de désinfection tel que l'ozone. À partir de dosage variés, ce puissant oxydant s'est révélé efficace dans le passé pour l'enlèvement de plusieurs produits pharmaceutiques. Toutefois, les études de ce genre menées en majorité lors de projets pilotes contenaient peu d'information spécifiques aux antidépresseurs. Donc, une étude a été complétée dans une station d'épuration où des effluents finaux ont été traités avec différentes doses d'ozone. Fait intéressant, malgré les bienfaits apportés par ce type de traitement, des analyses qualitatives par spectrométrie de masse haute résolution (LC-QqToFMS) d'extraits après ozonolyse a permis de mettre en lumière pour la première fois la formation de nouveaux sous-produits dont la toxicité demeure inconnue.

### 1.10. Structure de la thèse

Les chapitres de la thèse sont organisés de façon à montrer à la fois les nouveaux développements analytiques complétés et les différentes études permettant de mieux comprendre le devenir environnemental des antidépresseurs.

Le **Chapitre 2**, article publié dans *Analytical Chemistry*, décrit le développement d'une nouvelle méthode analytique permettant la détection et la quantification de 6 antidépresseurs et 4 métabolites *N*-desmethyl (incluant 4 paires de parent-métabolite, dont un métabolite formé par la perte d'un groupement méthyle à partir d'un méthoxy sur un phénol) dans les eaux usées d'une station d'épuration primaire physico-chimique par LC-(ESI)-MS/MS. Cette méthode a permis de diminuer de façon considérable les effets de matrice d'échantillons d'eaux usées chargés en matière organique en appliquant une purification par SPE avec cartouches échangeuses de cations. De plus, une phase mobile basique non traditionnelle composée d'une solution tampon de bicarbonate d'ammonium (10 mM, pH 7.8) a permis d'améliorer jusqu'à 14 fois l'intensité des signaux de détection. Des résultats d'application ont été rapportés pour des échantillons d'eaux usées (affluent, effluent) prélevés à la station d'épuration de la ville de Montréal et d'eaux de surface dans le Fleuve St-Laurent à 0.5 km du point de rejet de la station d'épuration.

Le **Chapitre 3**, article publié dans *Chemosphere*, décrit le développement d'une nouvelle méthode analytique permettant la détection et la quantification de 6 antidépresseurs et 4 métabolites *N*-desmethyl dans plusieurs tissus de poisson par LC-(ESI)-MS/MS. Cette méthode a permis l'extraction sélective d'un plus grand nombre d'antidépresseurs avec de meilleurs taux de récupération en comparaison aux méthodes existantes. Au cours de cette étude, les teneurs en antidépresseurs ainsi que leur distribution dans 3 tissus différents ciblés (foie, cerveau, filet) ont été rapportées pour des extraits de truites mouchetées juvéniles exposées à différentes concentrations d'effluent dilué traité et

non-traité à l’ozone. Pour une première fois dans la littérature, une corrélation a été établie entre les concentrations de 3 antidépresseurs dans le cerveau et l’activité d’un biomarqueur d’exposition (i.e. pompe N/K ATPase impliquée dans la régulation de la sérotonine) mesurée à partir de synaptosomes de truites exposées aux effluents.

Le **Chapitre 4**, article publié dans *Water Research*, décrit le développement d’une nouvelle méthode analytique permettant la détection et la quantification de 8 antidépresseurs, 6 métabolites *N*-desmethyl (incluant 6 paires de parent-métabolite) et l’antiépileptique carbamazépine dans les boues de traitement et les eaux usées de station d’épuration par LC-(ESI)-MS/MS. Les données d’efficacité de traitement de 5 stations d’épuration canadiennes opérant des traitements primaires physico-chimiques et secondaires biologiques ont été rapportées, ainsi que les teneurs des composés dans les boues de traitement de chacune des stations échantillonnées. Des valeurs de coefficients de sorption ( $K_d$ ) ont été calculées pour chacun des antidépresseurs faisant partie de cette étude.

Le **Chapitre 5**, article soumis dans *Chemistry Central Journal*, rapporte les résultats d’efficacité d’un traitement avancé de désinfection à l’ozone (5, 9 et 13 mg L<sup>-1</sup>) complété avec des échantillons finaux d’effluent provenant d’un traitement primaire physico-chimique. Caractérisation pour la première fois de nouveaux sous-produits *N*-oxyde (venlafaxine, desmethylvenlafaxine) par spectrométrie de masse à haute résolution (LC-QqToFMS) dans les échantillons d’effluent traités avec 5 et 9 mg L<sup>-1</sup> d’ozone. Étude confirmant la possibilité de formation de nouveaux sous-produits de toxicité inconnue.

## **Chapitre 2 : Détermination d'antidépresseurs basiques et leurs métabolites *N*-desméthyle dans les eaux brutes d'égouts et les eaux usées en utilisant l'extraction sur phase solide et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem**

---

Determination of basic antidepressants and their *N*-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Lajeunesse A., Gagnon C. et Sauvé S. 2008.

*Anal. Chem.*, 2008, 80 : 5325-5333.

### **Note sur ma contribution**

Ma participation aux travaux de recherche : J'ai réalisé les échantillonnages (station d'épuration, Fleuve St-Laurent), les manipulations, les analyses et l'interprétation des résultats.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires de Dr. Gagnon et du Prof. Sauvé, mes directeurs de thèse.



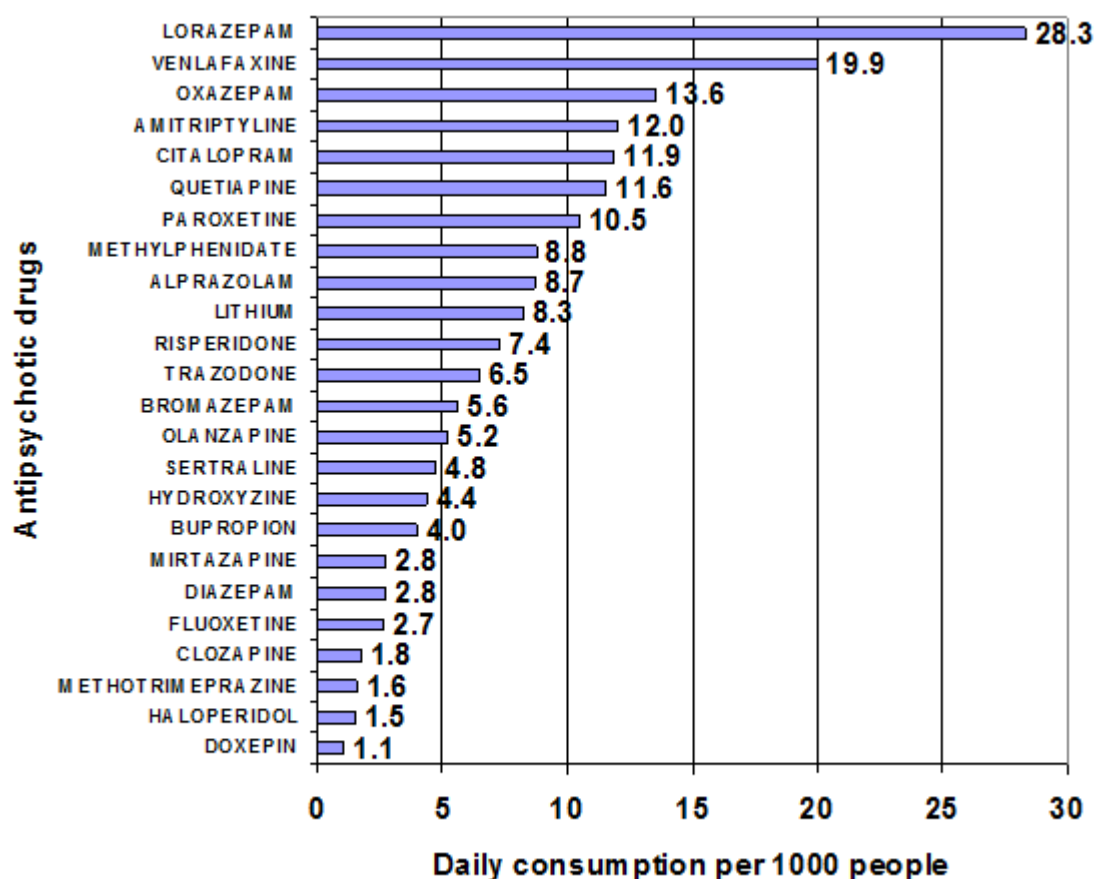
## Abstract

A novel analytical method has been developed for the determination of six basic antidepressants (venlafaxine, sertraline, paroxetine, citalopram, amitriptyline and fluoxetine) and four of their metabolites (*O*-desmethylvenlafaxine, desmethylsertraline, nortriptyline and norfluoxetine) in raw sewage and roughly primary-treated wastewater. For analytical development purposes, two ion exchange solid-phase extraction cartridges were compared. Extracts were analyzed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with positive-mode electrospray (+ESI) and selected reaction monitoring transitions. The choice of a basic mobile phase significantly improved the instrumental sensitivity (by up to 14-fold for norfluoxetine) relative to common +ESI acidic mobile phases. In addition to the remarkable gain in sensitivity, matrix effects were negligible in the raw sewage samples. Analyte recoveries ranged from 80 to 103%, and effluent detection limits from 0.048 to 0.10 ng L<sup>-1</sup>. Samples collected at the Montreal wastewater treatment plant showed the unequivocal presence of all the target compounds at concentrations of 2 to 346 ng L<sup>-1</sup>. The target antidepressants were also detected in samples taken from the effluent receiving waters (i.e. the St. Lawrence River), but at lower concentrations (0.41 to 69 ng L<sup>-1</sup>). The highly sensitive proposed method constitutes one of the best means for monitoring the environmental occurrence of tricyclic antidepressants, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and some of their metabolites.

## 2.1. Introduction

Pharmaceutical products, including drugs and their active metabolites, are labelled as emerging aquatic contaminants because of increasing reports of their occurrence in a variety of ecosystems and concerns about their potential environmental impacts (Halling-Sørensen et al., 1998; Daughton et Ternes, 1999; Kolpin et al., 2002; Metcalfe et al., 2003a; Lee, Peart et Svoboda, 2005; Nalcz-Jawecki). Antidepressants are among the many pharmaceutical substances likely to be found in the environment. With respect to global disease burden, depression is expected to be the second most serious illness by the year 2020 (Kupfer, 1999). In Canada, recent studies conducted by Health Canada reported that depression strikes about 20% of the Canadian population (Health Canada, 2002). This illness affects both the social and professional functions of its sufferers. In the latter case, the costs associated with treatment, medication, loss of productivity and premature death were estimated at \$14.4 billion per year in 2006 in Canada alone (IMS Health Canada, 2006). Estimates of daily consumption rates of antidepressants in the Province of Quebec are shown in **Figure 2-1**.

Commonly prescribed antidepressants are divided into three classes: monoamine oxidase inhibitors (MAOIs), tricyclic antidepressants, and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). Of these three classes, tricyclics and SSRIs work by blocking reuptake of neurotransmitters, especially norepinephrine, dopamine, and serotonin. The TC antidepressants and SSRIs are all widely metabolized and some metabolites retain a pharmacologic activity capable of contributing to serotonin reuptake inhibition and/or cytochrome P450 isozyme inhibition, thus mediating drug interactions (De Vane, 1999). Following oral ingestion in humans, the primary metabolites released are generally *N*-desmethyl products, followed in a somewhat lower proportion by conjugated or sulphate derivatives. Renal clearance has been reported to be low. In most cases, less than 12% of any SSRIs are excreted unaltered in urine (De Vane, 1999). However, Reddy et al. (2005),



**Figure 2-1.** Daily consumption of antipsychotic and antidepressant drugs in the Province of Quebec, Canada (number of pills bought in retail drug stores per thousand people) (IMS Health Canada, 2006).

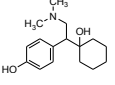
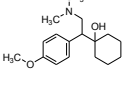
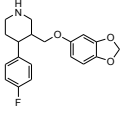
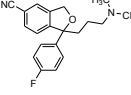
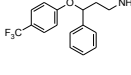
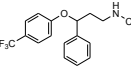
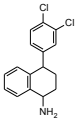
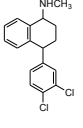
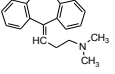
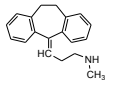

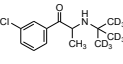
who studied conjugated estrogens, have reported a high probability that the glucuronide compounds in wastewater could be quickly dissociated to their free parent molecule by enzymatic or chemical decomposition. Thus, the expected concentrations of parent antidepressants would be much higher than the concentration reported in metabolism studies. Because of their transformation rates and the pharmacological activity of the metabolites, it is critical to determine the presence of parent compounds as well as their main metabolites. The antidepressants and metabolites selected for our study are listed in

table alongside their physicochemical properties (Wille et al., 2005) and respective chemical structures (**Tableau 2-1**).

The increasing use of antidepressants and their appearance in municipal wastewater creates the potential for physiological and behavioural effects on aquatic organisms. These molecules often act by modulating and mimicking the effects of the neurotransmitter serotonin (Fong, 2001). Since serotonin regulates a wide range of physiological systems, including vasoconstriction in fish (Sundin et al., 1995), reproduction in a variety of molluscs (Fong, 1998) and ciliary beating in protozoans (Rodriguez et Renaud, 1980), drugs that mimic its action could have tremendous effects on these and other organisms. The environmental monitoring of SSRIs based on sensitive and reliable analytical methods therefore becomes very important.

In the mid-1990s, only a few analytical methods had been developed for the determination of antidepressants, and these were for medical and clinical purposes alone (Eap et Baumann, 1996; Crifasil, Le et Long, 1997; Maurer et Bickeboeller-Friedrich, 2000; Wille et al., 2005; Massaroti et al., 2005; Himmelsbach et al., 2006). Due to the complexity of environmental matrices, these same methods cannot be used without significantly improving sample preparation and signal sensitivity. There are few reliable analytical methods specific enough for the detection and quantification of SSRIs in environmental samples. While some authors have recently described an interesting alternative method based on capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection (Himmelsbach et al., 2006), fairly high limits of detection (LOD) and limited linearity ranges were reported for river water samples, simplify that the detection of SSRIs and their metabolites would be even more difficult in sewage matrices. Till now, liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been a favourite for the detection of antidepressants in sewage (Metcalf et al., 2003b; Weigel et al., 2004; Gómez et al., 2006), surface water (Vanderford et al., 2003) and biota

**Tableau 2-1.** Physicochemical properties and molecular structures of target antidepressants and their metabolites.

Compounds	Structure	MW (g mol) <sup>-1</sup>	pKa <sup>1</sup>	log P <sup>1</sup>
Desmethylvenlafaxine (DVEN)		263.38	9.74	0.74
Venlafaxine (VEN)		277.41	9.24	0.43
Paroxetine (PAR)		329.37	9.90	3.95
Citalopram (CIT)		324.40	9.50	3.74
Norfluoxetine (NFLU)		295.30	9.37	n/a
Fluoxetine (FLU)		309.33	8.70	4.05
Desmethylsertraline (DSER)		291.06	n/a	n/a
Sertraline (SER)		306.23	9.48	5.29
Amitriptyline (AMI) <sup>†</sup>		277.40	9.4	3.00
Nortriptyline (NTRI) <sup>†</sup>		263.38	9.70	1.70
*cis-Tramadol <sup>13</sup> -d <sub>3</sub> (TRA)		267.35	9.41	1.35
**Bupropion-d <sub>9</sub> (BUP)		248.16	7.90	3.21

<sup>1</sup> Wille et al., 2005. MW: molecular weight; pKa: dissociation constant; log P: partition coefficient (octanol / water); n/a: not available; †: TC antidepressants; \* Internal standard; \*\* Surrogate standard.

(Brooks et al., 2005; Ramirez et al., 2007). The extraction of SSRIs and other pharmaceuticals from wastewater or surface-water samples was typically accomplished by solid-phase extraction (SPE) using polymeric sorbents such as polystyrene-divinyl-benzene (H<sub>2</sub>O-phillic™) (Himmelsbach et al., 2006) or polydivinylbenzene-vinylpyrrolidone (OASIS® HLB) (Metcalf et al., 2003b; Vanderford et al., 2003; Weigel et al., 2004; Gómez et al., 2006). Despite the high selectivity of these sorbents toward the target molecules, impurities within the matrix are also co-extracted, thus aggravating the susceptibility of electrospray ionization (ESI) to matrix effects (Vanderford et al., 2003; Gómez et al., 2006; Ramirez et al., 2007). Instrumental performance is often greatly affected by these interferences. The matrix effects, the basic character of the analytes, and the choice of mobile phase can all greatly affect the overall signal intensity and the chromatographic resolution (Mallet, Lu et Mazzeo, 2004).

This paper reports on an innovative and highly sensitive screening method for tricyclic antidepressants and SSRIs found in coarsely primary-treated wastewater samples. This protocol enables the simultaneous monitoring of six basic antidepressants and four of their *N*-desmethyl metabolites using LC-MS/MS with positive ESI. Key steps in the development of the method involved the comparison and optimization of two mobile phases of different composition and pH; and two SPE cartridges (e.g. mixed-mode Strata-X-C™, and strong cation-exchange Strata-SCX™). This paper evaluates sample recoveries along with matrix effects, and reports on sample integrity following a week-long storage period. The noteworthy sensitivity of the method was then challenged with analyses of trace residues of antidepressants in surface waters and in complex matrices like sewage samples.

## 2.2. Experimental section

### 2.2.1. Chemicals and standards

Fluoxetine, norfluoxetine, paroxetine, sertraline, and (*S*)-citalopram were provided by Toronto Research Chemical Inc. (North York, Ont., Canada). Desmethylertraline, venlafaxine, *O*-desmethylvenlafaxine, and bupropion-*d*<sub>9</sub> were obtained from Nanjing Jinglong PharmaTech (Nanjing, China). Amitriptyline and nortriptyline were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Miss., USA), while tramadol-<sup>13</sup>C-*d*<sub>3</sub> was purchased from Cerilliant Corp. (Round Rock, Texas, USA). All antidepressant products were of > 98% purity grade. The HPLC-grade solvents (methanol and acetonitrile) and ammonium hydroxide were provided by Caledon Laboratories Ltd. (Georgetown, Ont., Canada). Phosphoric acid (85%), formic acid (88%) and ammonium acetate (98%) were purchased from Sigma-Aldrich Co. Reagent-grade hydrochloric acid, acetic acid and ammonium bicarbonate were provided by American Chemicals Ltd. (Montreal, Que., Canada). Solid-phase extraction (SPE) cartridges of 6 mL, 200 mg (Strata-X-C™) and 500 mg (Strata-SCX™) were purchased from Phenomenex (Torrance, Calif., USA). Stock solutions of 100 mg L<sup>-1</sup> of each substance were prepared in methanol and stored at 4°C in amber glass bottles. For safety purposes, all corrosive and pure standard chemical were handled under a ventilated fume hood wearing appropriate protection gloves.

### 2.2.2. Tandem mass spectrometry

Mass spectrometry was performed using a TSQ Quantum Ultra™ triple quadrupole by Thermo Fisher Scientific Inc. equipped with an electrospray ionization source. The capillary was held at 5.0 kV and the cone was operated at an optimized voltage for each analyte in positive-ion mode (+ESI). Additional instrumental parameters were held

constant for all analytes: capillary temperature 300°C; gas collision pressure 1.5 mTorr; ion sweep gas pressure 1 mTorr; sheath gas 20 mTorr; skimmer offset 8; micro scans 1 / scan. The Xcalibur 1.2 software by Thermo Fisher Scientific was used for data acquisition and processing. To determine the optimal MS/MS transition in Selected Reaction Monitoring (SRM) for the target analytes, each compound was infused individually into the mass spectrometer at a nominal concentration of 3 mg L<sup>-1</sup> in a mobile-phase solution of ammonium bicarbonate (10 mM) pH 7.8 / acetonitrile (1:1) using a flow rate of 20 µL min<sup>-1</sup>. All analytes were initially scanned with Q1 between m/z 50 to 400 to enable identification of the most intense precursor or parent ion for each compound. The collision energy was then optimized, while Q3 was scanned to define and optimize the intensity of the product ions of each compound. All optimized parameters are listed in table (**Tableau 2-2**).

### 2.2.3. Liquid chromatography

Analyte separations were conducted with a Thermo Finnigan HPLC Surveyor System on a Gemini C18 column (150 x 2.0 mm i.d. x 3 µm; Phenomenex, Torrance, Calif.). The flow rate was set at 200 µL min<sup>-1</sup>. A binary gradient made of (A) ammonium bicarbonate (10 mM) pH 7.8 or ammonium acetate (10 mM) adjusted to pH 4.0 with formic acid (0.1%), and (B) acetonitrile was used to achieve chromatographic separation.

Details of the time-scheduled binary gradient are as follows: 10% of B was held for 3 min, then increased linearly to 65% by 9 min and held for 2 min before it was increased to 95% in 9 min and maintained isocratic for 0.5 min. A 3.5-min equilibration step at 10% of B was used at the end of each run to bring the total run time to 30 min. Volume injection was 5 µL for sewage samples and 20 µL for river samples.



**Tableau 2-2.** Optimized LC-(ESI+)-MS/MS conditions for the analysis of antidepressants and their metabolites.

Substances	$t_R$ (min)	SRM transitions (m/z)	CID (V) <sup>a</sup>	Tube lens (V)
Desmethylvenlafaxine	11.09	264 → 246 [M-H <sub>2</sub> O]	8	65
*Tramadol <sup>13</sup> -d <sub>3</sub>	13.12	268 → 250 [M-H <sub>2</sub> O]	11	57
Venlafaxine	14.53	278 → 260 [M-H <sub>2</sub> O]	8	57
Paroxetine	15.07	330 → 192 [M-C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ]	20	73
Citalopram	15.30	325 → 109 [M-C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> ON <sub>2</sub> ]	21	78
Norfluoxetine	16.10	296 → 134 [M-C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> OF <sub>3</sub> ]	10	32
Nortriptyline	16.91	264 → 233 [M-CH <sub>3</sub> N]	12	65
Fluoxetine	17.05	310 → 148 [M-C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> OF <sub>3</sub> ]	10	52
**Bupropion-d <sub>9</sub>	18.80	249 → 185 [M-C <sub>4</sub> D <sub>8</sub> ]	11	65
Desmethylsertraline	20.16	275 → 159 [M-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> ]	10	53
Amitriptyline	22.08	278 → 233 [M-C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> N]	14	65
Sertraline	22.47	306 → 275 [M-CH <sub>3</sub> N]	12	65

\* Internal standard      \*\*Surrogate standard

<sup>a</sup> CID: Collision-Induced Dissociation energy (V)

#### 2.2.4. Sample collection

The wastewater treatment plant (WTP) of the City of Montreal is the largest plant in North America, typically processing 2.5 million m<sup>3</sup> of raw sewage daily, with a representative mean effluent discharge of 19.8 m<sup>3</sup> sec<sup>-1</sup>. Primary treatment here consists of grit removal and a physicochemical treatment by flocculation and sedimentation of suspended matter (Montreal WWTP, 2012).

Twenty-four hour composite samples of raw sewage and wastewater were drawn at the treatment plant, while surface-water samples were collected with a Teflon pump at a 1-m depth in the St. Lawrence River, 0.5 km downstream of the effluent outfall. Samples were then transported to the laboratory in a Spartanburg™ stainless steel container and stored in the dark at 4°C for less than 24-h until filtration and extraction steps.

#### 2.2.5. Sample extraction

To remove suspended material, the aqueous samples were filtered under nitrogen flow from a Spartanburg™ container through a 142-mm glass-fibre filter (0.7 µm) held in place by a Millipore stainless steel holder. To each 500 mL of filtered sewage or surface-water sample were added 100 µL of a surrogate standard solution prepared in methanol (Bupropion-*d*<sub>9</sub>: 2.5 mg/L) and 5.0 mL of methanol before lowering the pH around 3 with 100 µL of phosphoric acid (85%). Meanwhile, strong cation-exchange (Strata-SCX) or mixed-mode (Strata-X-C) cartridges were conditioned with 4 mL of methanol followed by at least 8 mL of Milli-Q water. Solid-phase extraction (SPE) was performed with a VAC ELUT SPS24™ manifold (Varian) at an approximated flow rate of 10–15 mL min<sup>-1</sup>. After extraction, all cartridges were washed with 4 mL of HCl (0.1M) followed by 4 mL of methanol. The analytes were then eluted with 2 x 3 mL of a solution of 5% (v/v) NH<sub>4</sub>OH in methanol. The combined fractions were then mixed with 100 µL of a solution of *cis*-Tramadol<sup>13</sup>-*d*<sub>3</sub> in methanol (2.5 mg L<sup>-1</sup>) as the internal standard and evaporated to dryness

under a gentle stream of nitrogen gas. The dried extracts were then reconstituted with 1.0 mL of the mobile phase solution of ammonium bicarbonate (10 mM) pH 7.8 or ammonium acetate (10 mM) pH 4.0 / acetonitrile (1:1 v/v).

#### **2.2.6. Method validation**

Recovery tests were performed on spiked samples to determine the precision and accuracy of the method. Because the target analytes can be found in sewage samples (e.g. raw sewage and wastewater), standard addition experiments were completed to determine the recoveries of all substances. The percent recovery of antidepressants spiked into each type of water at a nominal concentration of  $500 \text{ ng L}^{-1}$  was calculated as follows: the ratios of the spiked samples (area analyte / area ISTD) was divided by the ratios of the  $500 \text{ ng L}^{-1}$  standards used in the addition calibration curve previously prepared by spiking set amounts of analytes in the extracted matrix. The instrumental limit of detection (LOD) was evaluated as  $3.3 \times (S_0 / m)$ , where  $S_0$  is the standard deviation of a regression curve in effluent (standard error converted to standard deviation) and  $m$  the slope value from standard addition calibration curve (Hayashi et al., 2005).

Matrix effects were investigated on influent and effluent samples. To prevent possible losses due to extraction, the ratios of the spiked standards ( $500 \text{ ng L}^{-1}$ ) minus the ratios of the extracted matrix alone (standards used in the addition calibration curve) were compared to the ratio of a  $500 \text{ ng L}^{-1}$  non-extracted standard prepared directly in the mobile phase. Hence, the relative signal response to matrix effects was calculated by dividing the signal obtained from a spiked sample in the matrix versus the signal of a pure non-extracted standard. Values around 1.0 indicate no appreciable signal suppression or enhancement.

For the stability test, 2 L of a 24-h composite sample of raw sewage and wastewater were collected from the Montreal WTP. The effluent sample was filtered through a 142-mm glass-fibre filter (0.7  $\mu\text{m}$ ) retained in a Millipore stainless steel holder, and split into two spiked (500  $\text{ng L}^{-1}$  with all studied compounds) 1-L sub-samples (A and B). The water contained in bottle A was poured into two 250-mL volumetric flasks then immediately extracted using the validated SPE procedure. Extracts were reconstituted with the mobile phase and analyzed on the same day. The second 1-L bottle (B) was kept in the dark at 4°C for seven days. After the storage period, bottle B was split between two 250-mL volumetric flasks and extracted under the same SPE conditions.

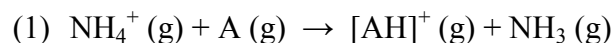
### 2.2.7. Data analysis

Peak areas, regression parameters and concentrations were calculated using the ICIS algorithm of Xcalibur 1.2 by Thermo Fisher Scientific. Aliquots of 100- $\mu\text{L}$  standard solutions of analytes (at three different concentrations: 0, 1.25 and 2.50  $\text{mg L}^{-1}$ ) containing the internal standard *cis*-Tramadol<sup>13</sup>-*d*<sub>3</sub> (concentration: 2.5  $\text{mg L}^{-1}$ ) were added to the extracted samples in order to build a standard addition calibration curve. The peak area ratios of each standard were plotted against the corresponding concentrations of the analytes i.e 0, 250 and 500  $\text{ng L}^{-1}$  based on a concentration factor of 500. Calibration curves were then calculated for each matrix by the least-squares method. The mean ratios ( $n = 3$ ) of the zero points in the calibration curve were used to quantify the analytes in each type of water. The calculated mean ratio of zero points was divided by the given slope value in the linear equation to give the final concentration. The linearity of addition calibration curves yielded  $r^2 > 0.996$  across a range of concentrations that are typical for the detected compounds in sewage samples. To ensure a good quality control of the entire extraction process, some blank samples were incorporated in each sequence. Moreover, surrogate standards of bupropion-*d*<sub>9</sub> (500  $\text{ng L}^{-1}$ ) were also added in a regular basis at the beginning of each extraction.

## 2.3. Results and discussion

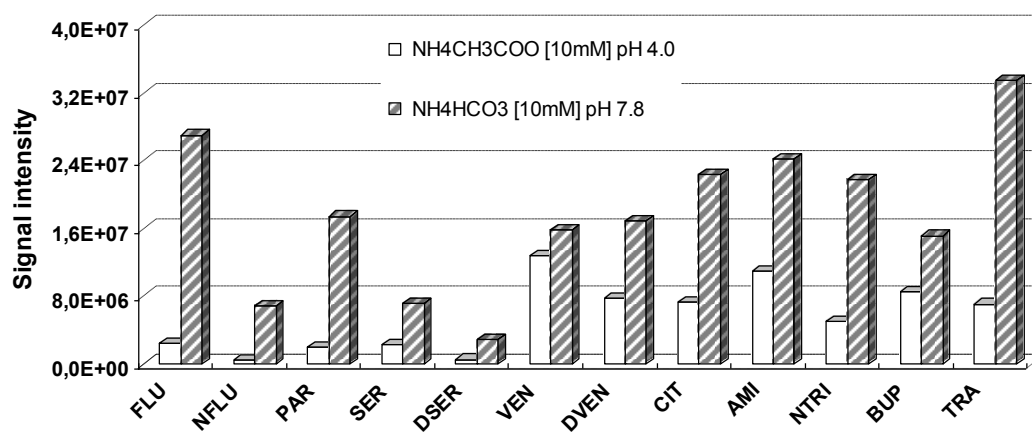
### 2.3.1. LC-MS/MS method

Among the different detection techniques that can be coupled to liquid chromatography (LC), mass spectrometry is the most suitable tool for environmental determinations due to its high selectivity and sensitivity. To get the best detection signal for all basic analytes, positive electrospray ionization (+ESI) was the interface of choice in the present study. As reported by Zhou and Cook (2000), many processes contribute to the ion abundance profiles in electrospray mass spectrometry. According to these authors, ionization in +ESI is strongly governed by the chemistry in the droplet surface layer through gas-phase chemical ionization of precursors present in solution (e.g.  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{COOH}$ ). Since all tricyclic antidepressants and SSRIs present basic characteristics with their amine moieties ( $\text{pK}_a$  around 9.0), the source of protons in solution becomes essential to convert the basic substances into their cationic form. For this purpose, many researchers have tried using dilute acids (Vanderford et al., 2003; Gómez et al., 2006; Ramirez et al., 2007), an ammonium acetate buffer (Weigel et al., 2003) or a mixture of both (Metcalf et al., 2003b) as the aqueous part of their mobile phase for the detection of antidepressants. In the present study, to improve ionization during the electrospray process, two mobile phases of ammonium salts with different counter anions (acetate and bicarbonate) were tested in acetonitrile (**Figure 2-2**). As shown by reactions (1), if antidepressant A has a relatively large proton affinity, the excess major ions  $\text{NH}_4^+$  should undergo a proton transfer reaction to yield some protonated antidepressants species (Hiraoka, Murata et Kudaka, 1995; Mallet, Lu et Mazzeo, 2004).



Remarkable improvements in signal sensitivity were observed (**Figure 2-2**) when using ammonium bicarbonate (10 mM – pH 7.8) as the mobile phase. Compared to the other counter anion acetate, much less ion suppression occurred during the desolvation process with bicarbonate than when using acetate as the counter anion. The difference in signal intensity between both ammonium salts could not be fully explained, the chemistry of the electrospray process by itself remains fairly complex.

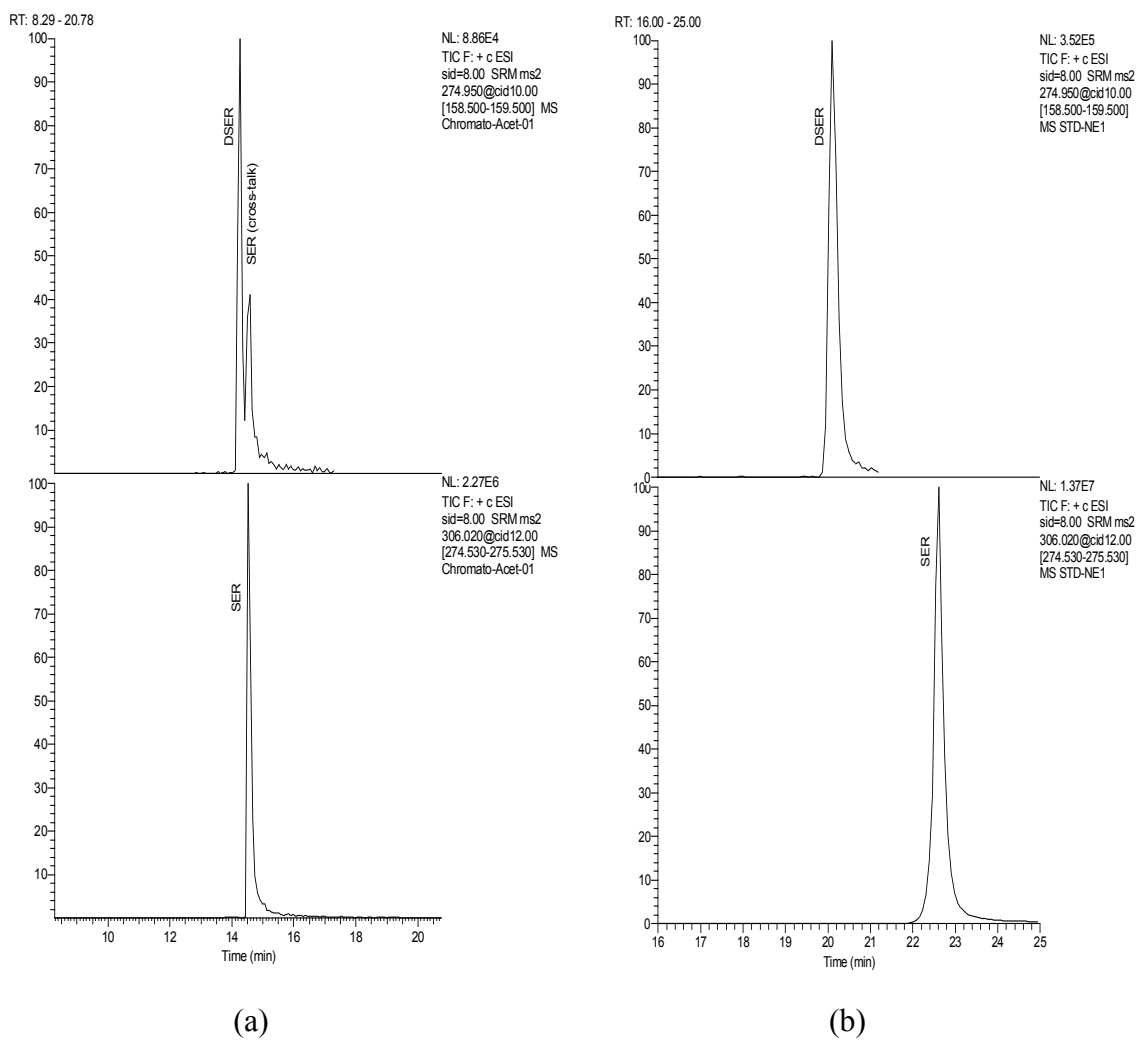
Among the substances being studied—norfluoxetine, fluoxetine, paroxetine and desmethylsertraline—had their signal ratios enhanced by 14, 11, 9 and 5 times higher, respectively, after optimization using the bicarbonate mobile phase. This major gain in sensitivity using this mobile phase was certainly crucial to detecting the antidepressants and metabolites in the dirty or diluted environmental matrices where they were barely detected in the past.



**Figure 2-2.** LC-(+ESI)-MS/MS signal intensity of two mobile phases tested for the determination of selected TC antidepressants, SSRIs and metabolites.

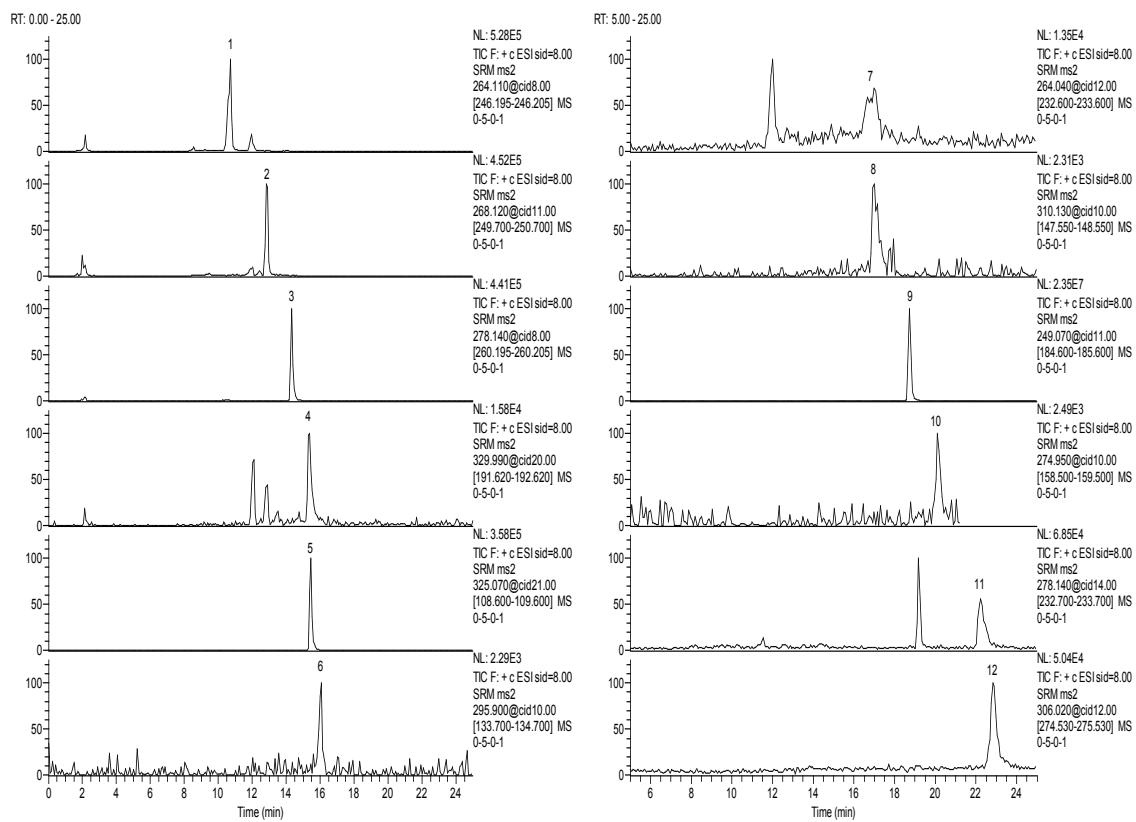
### 2.3.2. Chromatographic separation

Since antidepressants and some of their metabolites have similar structures and Collision Induced Dissociation (CID) energies, there were some potential “*cross-talk*” issues among Selected Reaction Monitoring (SRM) transitions. For instance, the same selected ion  $m/z$  275 was used in this current study for the fragment ion of sertraline and the parent ion of its metabolite desmethylsertraline. In addition, fragment ions  $m/z$  159 produced in less proportion during CID process for sertraline were also detected and scanned as main fragments of desmethylsertraline. Therefore, chromatographic separation of analytes was critical for the peak integration of these compounds. Initially, a short C18 column Synergi Fusion RP (50 x 2.0 mm i.d., 4  $\mu$ m; Phenomenex) was tested as the stationary phase for the separation of analytes using the mobile phase ammonium acetate (10 mM) pH 4.0 in acetonitrile (unpublished results). Unfortunately, this column could not satisfactorily separate the analytes and was quickly replaced by a longer Gemini C18 column (150 x 2.0 mm i.d.; 3  $\mu$ m; Phenomenex). Further chromatographic tests could not resolve the above two compounds (Figure 3a). However, changing the mobile phase improved resolution. In addition to signal enhancement, the basic mobile phase ammonium bicarbonate (10 mM - pH 7.8) also improved the retention of each compound, especially between sertraline and its metabolite desmethylsertraline (**Figure 2-3b**). Under the selected chromatographic conditions, all analytes and standards were resolved in less than 24 min, thus preventing possible analytical interferences caused by “*cross-talk*”. The time-scheduled SRM chromatogram of the analytes in the receiving waters of the St. Lawrence River at a site 0.5 km from the effluent outfall is shown in **Figure 2-4**.



**Figure 2-3.** Chromatographic resolution of sertraline and its metabolite *N*-desmethylsertraline using two mobile phases of different pH and composition: (a)  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  10 mM pH 4.0, (b)  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM pH 7.8.





**Figure 2-4.** Time-scheduled SRM chromatograms of TC antidepressants, SSRIs and some of their metabolites in the receiving waters of the St. Lawrence River 0.5 km from the effluent outfall: (1) desmethylvenlafaxine, (2) tramadol<sup>13</sup>-d<sub>3</sub>, (3) venlafaxine, (4) paroxetine, (5) citalopram, (6) norfluoxetine, (7) nortriptyline, (8) fluoxetine, (9) bupropion-d<sub>9</sub>, (10) desmethylsertraline, (11) amitriptyline, (12) sertraline.

### 2.3.3. Solid-phase extraction (SPE) and matrix effects

To extract the analytes from aqueous samples and significantly reduce co-extractive impurities from matrices, SPE was investigated using two types of cartridges: Strata-X-C and Strata-SCX (Phenomenex). As the antidepressants can hold a positive charge at  $\text{pH} < \text{pK}_a$ , mixed-mode and strong cation exchange cartridges could be of interest. Unlike polymeric cartridges such as OASIS HLB or Strata-X, cation exchanger cartridges can be washed with highly polar solvents (e.g. pure methanol) without losing any of the studied compounds. The Strata-SCX cartridge was chosen for SPE because of its superior extraction recoveries for all analytes in purified water (**Tableau 2-3**). The overall recoveries of antidepressants, their metabolites and the surrogate standard were 87–103% in purified water, 81–90% in wastewater treatment plant (WTP) effluent, and 80–87% in raw sewage. Combining different interaction mechanisms (e.g. mixed-mode sorbent with similar  $\pi$ - $\pi$  interactions as Strata-X cartridges, and ionic exchange capacity such SCX cartridges) can be interesting for the extraction of a variety of compounds, but it can also lead to co-extraction of matrix compounds that are not of interest, leading to more ion suppression with LC-MS/MS in the final analysis (Mallet, Lu et Mazzeo, 2004). Given that the Strata-X-C cartridges have a limited bed mass resin (200 mg), the lowest recoveries obtained with these cartridges can possibly be explained by the fact that the ion-exchange mechanism is dominating the retention. Therefore, a mixed-mode sorbent has less ion-exchange groups than a strong cation exchanger. When examining the eluting solvent, methanol–ammonia 5% (v/v) was found to be suitable for eluting all substances from Strata-SCX cartridges. Other elution tests completed with a less polar solution of acetonitrile–ammonia 5% (v/v) yielded lower mean recoveries (by 50%) for most analytes.

**Tableau 2-3.** Recoveries and estimated limits of detection (LOD) of selected antidepressants and some of their metabolites in spiking experiments with 500 mL of various aqueous matrices (nominal concentration 500 ng L<sup>-1</sup>).

Compounds	Milli-Q water recoveries (%)		Sewage effluent recoveries (%)	Raw sewage recoveries (%)	Sewage effluent LOD
	Strata-X-C (n=3)	Strata-SCX (n=3)	Strata-SCX (n=3)	Strata-SCX (n=3)	Concentration range (ng L <sup>-1</sup> )
Desmethylvenlafaxine	61 ± 1	103 ± 1	86 ± 7	82 ± 6	0.097
Venlafaxine	90 ± 3	103 ± 4	81 ± 8	81 ± 6	0.10
Paroxetine	70 ± 1	87 ± 2	86 ± 5	81 ± 4	0.096
Citalopram	93 ± 1	102 ± 3	84 ± 9	82 ± 3	0.077
Norfluoxetine	76 ± 3	100 ± 1	88 ± 6	85 ± 5	0.087
Nortriptyline	54 ± 1	98 ± 2	82 ± 5	80 ± 4	0.057
Fluoxetine	88 ± 2	98 ± 2	88 ± 4	86 ± 4	0.050
Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	89 ± 8	102 ± 4	99 ± 8	99 ± 2	-----
Desmethylsertraline	76 ± 2	90 ± 2	82 ± 5	82 ± 2	0.072
Amitriptyline	95 ± 4	102 ± 2	84 ± 8	84 ± 3	0.077
Sertraline	86 ± 2	97 ± 2	90 ± 7	87 ± 6	0.048

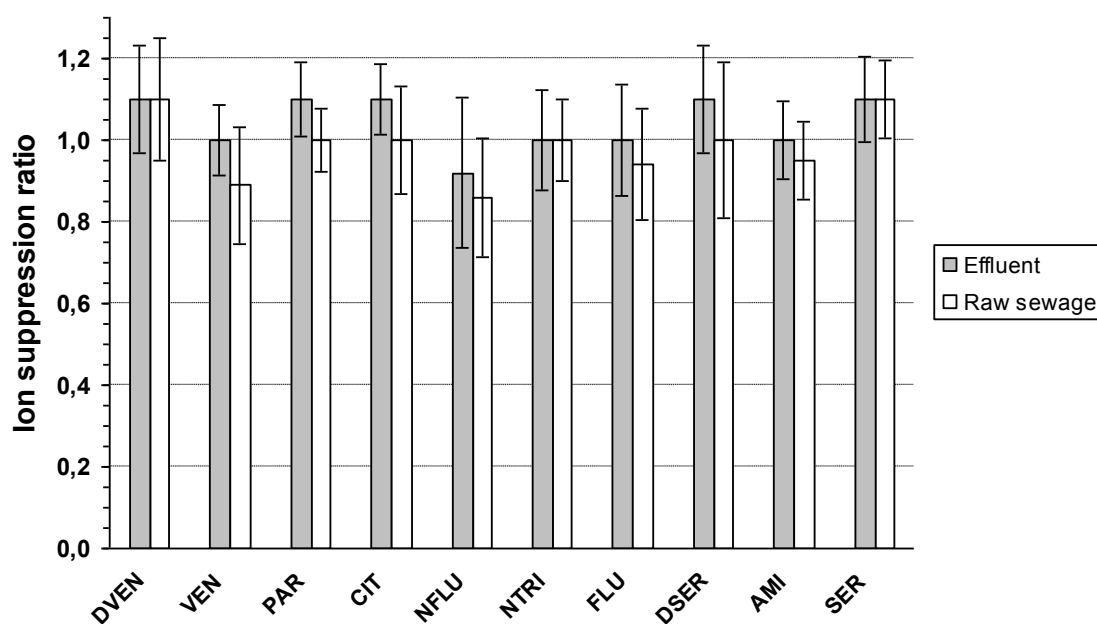
One significant drawback of electrospray mass spectrometry is that the ionization source is highly susceptible to co-extracted matrix components. The matrix effects can typically result in the suppression or, less frequently, the enhancement of the analytic signal (Gómez et al., 2006). The LC-MS/MS signal response obtained from standard and matrix samples may differ significantly. As a result, matrix effects represent a real challenge for analytical chemists and researchers.

An evaluation of signal suppression was conducted in this study to assess its effect on the quantification of antidepressants using real, complex matrix samples. The signal suppression observed was expressed as ion suppression ratio described earlier. Raw sewage and WTP effluents were chosen to investigate matrix effects. **Figure 2-5** clearly depicts limited matrix effects on the overall ion signal. There was no significant ion suppression or enhancement for either test water. The results indicate that co-extracted organic matter in sewage samples was efficiently removed during the SPE procedure by an aggressive washing step involving HCl 0.1M and methanol. The most suppressed substance was norfluoxetine, with respective ion suppression ratios in effluent and sewage of  $0.9 \pm 0.2$  and  $0.9 \pm 0.1$ . In order to overcome possible matrix effects, we used standard addition calibration curves for quantitation. Furthermore, before each extraction, the standard surrogate bupropion-*d*<sub>9</sub> was used to ensure the quality control of the SPE procedure.

#### 2.3.4. Stability of spiked effluent samples

As it is often difficult to extract real samples on the same day after collection in the field, the validity of an analytical result relies entirely on the integrity of the target compounds in the sample matrix. This is especially crucial for samples taken from a wastewater treatment plant. However, despite its importance, this information is rarely available in the literature. Stability tests were completed on spiked sewage effluent samples stored for seven days at 4°C in the dark following the protocol detailed earlier. The results in table (**Tableau 2-4**) show that all antidepressants and metabolites were recovered to a

level > 82% after seven days of storage. The most degraded substances were the metabolites desmethylsertraline and norfluoxetine with respective loss of 18% and 17%. The stability of TC antidepressants, SSRIs and metabolites in spiked sewage effluents under defined storage conditions suggests that the substances are fairly stable for about seven days in similar matrices.



**Figure 2-5.** Investigated matrix effects of TC antidepressants, SSRIs and some of their metabolites expressed as ion suppression ratio.

**Tableau 2-4.** Percent recovered of selected antidepressants and some of their metabolites in spiked sewage effluent after seven days of storage at 4°C.

Compounds	Initial concentration (ng L <sup>-1</sup> )	% recovered from initial concentration (n = 2)
		7 days storage
Desmethylvenlafaxine	830	92 ± 1
Venlafaxine	714	91 ± 1
Paroxetine	505	94 ± 1
Citalopram	557	92 ± 1
Norfluoxetine	503	83 ± 1
Nortriptyline	504	91 ± 2
Fluoxetine	502	92 ± 1
Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>	500	93 ± 2
Desmethylsertraline	507	82 ± 1
Amitriptyline	522	90 ± 1
Sertraline	506	90 ± 1

### 2.3.5. Application to environmental analysis

The results of the analysis of environmental samples showed that all target compounds were found in the Montreal WTP. The extraction procedure was successfully applied to the analysis of 24-h flow proportional composite samples of raw sewage and effluents. Among the substances measured, the metabolite *O*-desmethylvenlafaxine (DVEN) was found at the highest concentration ( $346 \pm 20$  ng L<sup>-1</sup>) in sewage, while the metabolite nortriptyline (NTRI) was retrieved in the effluents at the lowest concentration of  $1.5 \pm 0.1$  ng L<sup>-1</sup> (**Tableau 2-5**). Since there are very few environmental studies available on

antidepressants and their metabolites in the literature, limited comparisons could be made on the occurrence of such substances in sewage samples. In fact, all existing analytical methods have limited their choices of antidepressants and metabolites. Likewise, due to matrix effects related to difficult matrices, numerous “not detected” results were often reported. Nevertheless, concentrations of venlafaxine (VEN), citalopram (CIT) and fluoxetine (FLU) are found to be consistent with the concentrations previously reported elsewhere. Hence, average concentrations of VEN ( $195 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$ ), CIT ( $52 \pm 2 \text{ ng L}^{-1}$ ), and FLU ( $2.9 \pm 0.1 \text{ ng L}^{-1}$ ) were found to be comparable with those reported in Austria (VEN:  $155 \pm 11 \text{ ng L}^{-1}$ ; CIT:  $170 \pm 13 \text{ ng L}^{-1}$ ) (Himmelsbach et al., 2006) and Canada (FLU:  $62 \pm 5 \text{ ng L}^{-1}$ ) (Metcalf et al., 2003b). Interestingly, amounts of certain antidepressants detected in Montreal’s WTP are fairly well correlated with the daily consumption of antidepressants in Quebec (**Figure 2-1**).

The reported results from the Montreal WTP show that the current physicochemical treatment process (based on flocculation) removes little of the compounds targeted by this study; this parallels the findings of other studies for pharmaceutical residues (Lajeunesse et Gagnon, 2007; Segura et al., 2007). It is also consistent with all the substances being detected 0.5 km away from the effluent outfall in the receiving waters of the St. Lawrence River. Thus, concentrations of our target compounds in surface water ranged from  $0.41 \pm 0.02 \text{ ng L}^{-1}$  for nortriptyline to  $69 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$  for *O*-desmethylvenlafaxine. Yet again, only a limited comparison could be made with previously published surface water concentrations. The antidepressant fluoxetine was detected at a mean concentration of  $0.86 \pm 0.06 \text{ ng L}^{-1}$ , compared with  $5.5 \pm 1.5 \text{ ng L}^{-1}$  in Nevada (United States) (Vanderford et al., 2003) and  $30 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$  in Ontario (Canada) (Metcalf et al., 2003b).

**Tableau 2-5.** Mean concentrations (ng L<sup>-1</sup>) of antidepressants and metabolites retrieved in Montreal WTP samples and at a site 0.5 km of the effluent outfall in the receiving waters of the St. Lawrence River.

Compounds	Montreal WTP				St. Lawrence receiving waters	
	12 June 2007		11 September 2007		17 July 2007	25 September 2007
	Raw sewage (n = 3)	Effluent (n = 3)	Raw sewage (n = 3)	Effluent (n = 3)	0.5 km from outfall (n = 2)	0.5 km from outfall (n=2)
Desmethylvenlafaxine	274 ± 27	223 ± 17	346 ± 20	330 ± 10	21 ± 1	69 ± 3
Venlafaxine	196 ± 25	176 ± 13	213 ± 8	215 ± 4	13 ± 1	46 ± 2
Paroxetine	5.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.6 ± 0.3	5.2 ± 0.5	1.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1
Citalopram	53 ± 5	47 ± 1	52 ± 4	58 ± 1	3.4 ± 0.2	12 ± 1
Norfluoxetine	4.2 ± 0.5	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Nortriptyline	3.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	4.5 ± 0.4	3.8 ± 0.4	0.41 ± 0.02	0.73 ± 0.06
Fluoxetine	3.5 ± 0.3	3.7 ± 0.1	3.1 ± 0.3	2.0 ± 0.1	0.42 ± 0.01	1.3 ± 0.1
Desmethylsertraline	5.0 ± 0.8	3.6 ± 0.3	4.2 ± 0.6	4.7 ± 0.5	2.3 ± 0.1	4.5 ± 0.4
Amitriptyline	18 ± 1	16 ± 1	21 ± 1	21 ± 2	0.87 ± 0.07	3.7 ± 0.2
Sertraline	6.0 ± 0.4	5.1 ± 0.3	6.1 ± 0.3	5.8 ± 0.8	0.84 ± 0.09	2.4 ± 0.1



## 2.4. Conclusion

A sensitive, specific, and rugged analytical method was developed for the analysis of tricyclic antidepressants, SSRIs and some of their *N*-desmethyl metabolites in complex matrices like sewage and wastewater. Unlike other multi-residue analytic methods, a noteworthy gain in instrument sensitivity in +ESI was observed using a basic mobile phase composed of ammonium bicarbonate (10 mM - pH 7.8) instead of conventional acidic mobile phases with diluted acid or buffered ammonium acetate (2–20 mM) solutions. In addition to signal improvement, the basic mobile phase allowed for good chromatographic resolution between parent molecules and metabolites, avoiding possible “*cross-talk*” interferences by enhancing retention of the basic compounds onto the reversed-phase C18 column. The optimized SPE method using strong cation-exchange cartridges (Strata-SCX) yielded good recoveries (> 81%) in all waters tested. Matrix effects investigated in spiked effluents and raw sewage samples were negligible using our chosen SPE procedure. Application of the novel method showed that all the selected analytes were detected at concentrations ranging from low  $\mu\text{g L}^{-1}$  to trace levels  $\text{ng L}^{-1}$  in Montreal’s wastewater treatment plant effluent and influent, as well as in the diluted St. Lawrence receiving waters. The method developed in this study proved to be a valuable tool in the analytical characterization of antidepressants and their *N*-desmethyl metabolites in both roughly primary-treated wastewater and surface-water samples. This LC-MS/MS method may also become useful for solid and biota sample applications.

## 2.5. Acknowledgements

The authors are indebted to P.-J. Čejka and C. Yelle from the Montreal Wastewater Treatment Plant, for their technical assistance. C. Lessard and S. Trépanier from Environment Canada are also acknowledged for their assistance during the boat sampling campaigns. Financial support was provided by the St. Lawrence Action Plan and the Canadian Foundation for Innovation.

# **Chapitre 3 : Distribution d'antidépresseurs et leurs métabolites à l'intérieur de truites mouchetées exposées à des eaux usées municipales avant et après traitement à l'ozone – Preuve d'effets biologiques**

---

Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment - Evidence of biological effects

Lajeunesse A., Gagnon C., Gagné F., Louis S., Čejka P., Sauvé S. 2008.

*Chemosphere*, 2011, 83 : 564-571.

## **Note sur ma contribution**

Ma participation aux travaux de recherche : J'ai réalisé les manipulations, les analyses et l'interprétation des résultats.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires de Dr. Gagnon et du Prof. Sébastien Sauvé, mes directeurs de thèse.

Collaboration des co-auteurs : Séverine Louis a réalisé les dissections de spécimens de truite et les tests d'activité du biomarqueur Na/K-ATPase, alors que Patrick Čejka était responsable des mésocosmes d'exposition à la station d'épuration de la ville de Montréal.

Le Dr. François Gagné, chercheur scientifique à Environnement Canada a participé à la réalisation des graphiques et des statistiques associés à l'activité du biomarqueur Na/K-ATPase, ainsi qu'à la révision du manuscrit.

## Abstract

This study examined the tissues distribution of selected serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in brook trout exposed for 3 months to continuous flow-through primary-treated effluent before and after ozone treatment. A reliable analytical method was developed for the quantification of trace amounts of antidepressants in small tissue homogenate extracts. Levels of six antidepressants and four of their *N*-desmethyl metabolites were determined using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Significant amounts of the SSRIs were found in fish tissue—in decreasing order: liver > brain > muscle. Sertraline and its metabolite desmethylsertraline were the predominant substances observed in most tissues (0.04-10.3 ng g<sup>-1</sup>). However, less SSRIs (0.08-1.17 ng g<sup>-1</sup>) were bioaccumulated in the ozonated effluent. The early molecular effects of these SSRIs on the Na/K-dependent ATPase pump activity in brain synaptosomes were also investigated in vitro and in fish exposed to the municipal effluents. With respect to their potential biological effects, in vitro exposure to selected SSRIs induced a reduction of the brain Na/K-ATPase activity in synaptosomes in a dose-dependent manner. Results showed that Na/K-ATPase activity was readily inhibited by exposure to municipal effluent before and, to a lesser extent, after ozone treatment. Moreover, the Na/K-ATPase activity was significantly and negatively correlated with brain tissue concentrations of fluoxetine ( $r = 0.57$ ;  $p < 0.03$ ), desmethylsertraline ( $r = -0.84$ ;  $p < 0.001$ ), and sertraline ( $r = -0.82$ ;  $p < 0.001$ ). The present study reveals that SSRIs are readily available in fish, biologically active and corroborates previous findings on the serotonergic properties of municipal effluents to aquatic organisms.

### 3.1. Introduction

Over the last decade, pharmaceutical and personal-care products (PPCPs) have been recognized as a major source of pollution for the aquatic environment (Halling-Sørensen et al., 1998; Daughton et Ternes, 1999). Their occurrence in most municipal effluent seems to indicate that conventional wastewater treatments have only a limited ability to remove such substances from sewage. In the 1990s, it was discovered that some active drugs have the capability to interfere with ecosystems in concentrations as low as a few nanograms per liter (Halling-Sørensen et al., 1998). Until now, different pharmaceutically active compounds (PhACs) have been detected in the environment: analgesics, antibiotics, antiepileptics, antidepressants, synthetic and natural hormones, etc. (Jones et al., 2006; Lishman et al., 2006). Antidepressant drugs are among the PhACs likely to be found in Canada (IMS Health Canada, 2006), United States (Schultz et al., 2010), and other countries around the world (Calisto et Esteves, 2009). The commonly prescribed antidepressants from the class of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have become the most successful class of marketed antidepressants, with the number of new prescriptions written for these drugs now exceeding that of TC antidepressants (De Vane, 1999).

To date, most analytical methods for determining the presence of antidepressants and their respective metabolites in environmental matrixes have been developed for surface waters and wastewater effluents (Lishman et al., 2006; Schultz et Furlong, 2008; Lajeunesse et al., 2008; Metcalfe et al., 2010), sediments (Schultz et al., 2010), and sewage sludge (Radjenović et al., 2009). Due to the complexity of samples, these analyses typically employ liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Since the occurrence of antidepressants in municipal wastewater could lead to physiological and behavioural effects on aquatic organisms (Calisto et Esteves, 2009; Fong, 1998; Fong, 2001), it is critical that these compounds be measured in organisms using reliable analytical

methods. Even so, only a few analytical methods have been reported on antidepressants in aquatic organisms (Brooks et al., 2005; Ramirez et al., 2007; Chu et Metcalfe, 2007; Metcalfe et al., 2010; Schultz et al., 2010). Unfortunately, the required mass of tissues often reached up to 2 g, making difficult the detection of SSRIs and their metabolites with small organisms or limited quantity of target tissues.

As antidepressants are present at relatively low levels in the environment e.g. ng L<sup>-1</sup>, risk for acute toxic effects is unlikely, but chronic environmental toxic effects cannot be excluded (Carlsson et al., 2006; Péry et al., 2008). The potential ecotoxicological impacts of neuroactive drugs on aquatic organisms are not well understood at the present time. Moreover, the lack of information about the fate and long-term subtle effects of these compounds and/or their metabolites in aquatic organisms makes accurate risk assessment difficult (Gagné et Blaise, 2004; Stanley et al., 2007; Paterson et Metcalfe, 2008). Hence, the measurement of the Na/K-dependent ATPase pump activity in synaptosomes represents a more specific biomarker of the effects of SSRIs (Kano et al., 1998). The serotonin reuptake pump (or transporter) exchanges one K ion per molecule of serotonin. The loss of K ions outside the synapse button is counterbalanced by the Na/K-ATPase pump which maintains Na and K ions respectively outside and inside of the membrane. This process requires energy (e.g.  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{inorganic phosphate}$ ) that can be easily measured (Kakko et al., 2003). Thus, the presence of SSRIs decreases the serotonin-dependent hydrolysis of ATP in neuron synaptosomes by the competitive inhibition of the transporters. At present, the modulation of Na/K-dependent ATPase activity in nerve synaptosomes by the SSRIs in fish is largely unknown. Despite its possible usefulness, this promising methodology alone cannot bring sufficient information about the exact concentration of drug needed to elicit biological effects in fish. Therefore, a combination of a biomarker of effects and a tissue SSRIs analysis would strengthen the link between the presence of this class of contaminants in target tissues and the resulting early biological effects.

In this study, we report the development of a reliable LC-MS/MS method for the trace detection of antidepressants in tissues of brook trout exposed to treated (ozone 15 mg L<sup>-1</sup>) and non-disinfected effluent at the Montreal wastewater treatment plant (WWTP). The developed method was applied to determine the concentrations and distribution of antidepressant in liver, brain, and muscle tissues. Based on bioaccumulation results, a new efficient biomarker (Na/K/serotonin-dependent ATPase activity in neurons synaptosomal membranes) is proposed to track the early biological effects of SSRIs.

## 3.2. Experimental

### 3.2.1. Chemicals and standards

Certified standards (> 98% purity grade) fluoxetine (FLU), norfluoxetine (NFLU), paroxetine (PAR), sertraline (SER), and (*S*)-citalopram (CIT) were provided by Toronto Research Chemical Inc. (North York, Ontario, Canada). Desmethylsertraline (DSER), venlafaxine (VEN), *O*-desmethylvenlafaxine (DVEN), and bupropion-*d*<sub>9</sub> were obtained from Nanjing Jinglong PharmaTech (Nanjing, China). Amitriptyline (AMI) and nortriptyline (NTRI), HEPES, sodium chloride, sodium hydroxide, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dithiothreitol, aprotinin, sucrose, magnesium chloride, and the bioluminescence commercial ATP detection kit based on luciferin/luciferase enzymatic system were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA), while cis-tramadol<sup>13</sup>C-*d*<sub>3</sub> was purchased from Cerilliant Corp. (Round Rock, Texas, USA). The high-performance liquid chromatography-grade solvents (methanol and acetonitrile) and ammonium hydroxide were provided by Caledon Laboratories Ltd. (Georgetown, Ontario, Canada). Reagent-grade hydrochloric acid, acetic acid, monobasic potassium phosphate, and ammonium bicarbonate were provided by American Chemicals Ltd. (Montreal, Quebec, Canada). Solid-phase extraction (SPE) cartridges of 6 mL, 500 mg (Strata-SCX™) were purchased from Phenomenex (Torrance,

California, USA). Stock solutions of 100 mg L<sup>-1</sup> of each substance were prepared in methanol and stored at 4°C in amber glass bottles. All corrosive and pure standard chemicals were handled carefully under a ventilated fume hood wearing appropriate protection.

### 3.2.2. Experimental procedures

#### 3.2.2.a. Instrumental parameters

A Thermo Finnigan Surveyor liquid chromatograph (LC) quaternary pump equipped with an autosampler was used in this study. As reported in a previous paper (Lajeunesse et al., 2008), analytes were separated on a C18 column using a binary gradient made of (a) ammonium bicarbonate (10 mM) pH 7.8, and (b) acetonitrile at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. Volume of injection was 20 µL for biota extracts.

Eluted analytes were monitored by a Thermo Finnigan TSQ Quantum Ultra triple quadrupole tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source. The capillary was held at 5.0 kV and the cone was operated at an optimized voltage for each analyte in positive-ion mode (+ESI). Additional instrument parameters and analytical details are available (Lajeunesse et al., 2008). The specificity of all target analytes was insured by the use of two MS/MS transitions in multiple reactions monitoring (MRM) mode. All optimized mass spectrometer parameters are available as **Supplementary material (Tableau 3-3)**.

### 3.2.2.b. Fish collection and preparation

Brook trout (*Salvelinus fontinalis*), 20 cm long, were obtained from a commercial fish hatchery (Station piscicole Trois-Lacs of Wotton, Quebec, Canada). A total of 50 fish per mesocosm (volume capacity of 150 L) were exposed for 3 months at the Montreal WWTP to 10 and 20% v/v of final effluent (mean effluent flow rate of 140 mL min<sup>-1</sup>). Additional hatched trout were exposed to 10 and 20% v/v of effluent previously treated with 15 mg L<sup>-1</sup> of ozone. During exposition, around 15% of mortality by microbiological infections was observed in mesocosms containing diluted final effluent. However, no fish mortality was reported in mesocosms containing final effluent treated with ozone. Typically, the Montreal WWTP processes 2.7 million m<sup>3</sup> of raw sewage daily, yielding a representative mean effluent discharge of 19.8 m<sup>3</sup> sec<sup>-1</sup>. Final effluent is discharged directly into the St. Lawrence River. Montreal's treatment plant uses a physico-chemical process, which involves a grit removal and a physicochemical treatment by flocculation and sedimentation to reduce suspended matter and phosphorus content. Dissolved organic carbon (DOC) concentrations and pH values ranged from 90 to 110 mg L<sup>-1</sup> and 8.1 to 8.2 respectively (Gagnon et al., 2008). Brook trout were dissected in order to obtain brain, liver, and filet (muscle) tissues. Because of limited quantities, fish homogenates (100 mg) composed of pooled tissue (10 living specimens for each tested condition) were diluted in 1.0 mL of an ice-cold 10 mM HEPES–NaOH (pH 7.4) buffer solution containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, and 1 µg mL<sup>-1</sup> aprotinin. All tissues samples were stored at -80°C until analysis.

### 3.2.2.c. Sample extraction

Fish homogenate samples were combined with 9 mL of a solution composed of methanol / 0.1 M acetic acid buffer solution pH 4.0 (1:1 v/v) in a 16 x 150 mm borosilicate glass screw-top conical tube. To each tube were added 100 µL of a surrogate standard



solution in methanol (bupropion-*d*<sub>9</sub>: 0.25 mg L<sup>-1</sup>) equivalent to 25 ng. Samples were then shaken vigorously and mixed on a rotary extractor (Caframo REAX 2) for 15 minutes. After extraction, samples were centrifuged at room temperature at 320 x g for 5 minutes. Following the solid-phase extraction (SPE) protocol of Lajeunesse et al. (2008), supernatants were transferred to strong cation exchange cartridges (Strata-SCX, Phenomenex) preconditioned with 4 mL of methanol and at least 8 mL of the same extraction buffer solution. The dried extracts containing 50 µL of cis-Tramadol<sup>13</sup>-*d*<sub>3</sub> in methanol (2.5 mg L<sup>-1</sup>) as an internal standard (ISTD) were reconstituted with 0.5 mL of the mobile phase solution composed of ammonium bicarbonate (10 mM) pH 7.8 / acetonitrile (1:1 v/v).

#### *3.2.2.d. Na/K-ATPase activity determinations*

Total serotonin content and the activity of Na/K-dependent and Mg-dependent ATPases in synaptosomal membranes were determined in brain tissue based on a previous methodology (Kakko et al., 2003). Brain synaptosomes were prepared from the homogenates as follows: homogenates (a portion was kept for total serotonin) were centrifuged at 3 000 x g for 15 min at 2°C. The supernatant was overlaid on cold 0.8 M sucrose containing 10 mM HEPES-NaOH and 1 mM EDTA prior to centrifugation at 10 000 x g for 20 min at 2°C. The synaptosomes (in the 0.8 M sucrose fraction) were collected from the mitochondria (pellet) and diluted by one third in distilled water. Na/K-ATPase and Mg-ATPase activities were determined in synaptosomes by mixing the synaptosomes with 100 µM ATP with or without 50 µM serotonin in 10 mM HEPES-NaOH buffer at pH 7.4 in the presence of either 140 mM NaCl and 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> or 50 mM MgCl<sub>2</sub>. The reaction mixture was incubated for up to 30 min at 30°C, and the levels of ATP were measured using a commercial ATP detection kit based on a luciferin / bioluminescence luciferase enzymatic system. The effects of serotonin and selected SSRIs (CIT, AMI, PAR, and FLU) were also examined in the synaptosomes from control (unexposed) fish. This process

involved pre-treating the membranes to increasing concentrations of PAR and SER for 15 min before taking the ATPase measurements. The data were expressed as ATP hydrolysis  $\text{min}^{-1} \text{ mg proteins}^{-1}$ . Total serotonin levels were also determined using a competitive immunoassay procedure developed in our laboratory. Details about this protocol are available as **Supplementary material** in section 3.6.

### 3.3. Results and discussion

#### 3.3.1. Chemical analysis

##### 3.3.1.a. LC-MS/MS method validation

Recovery tests were completed on spiked reference brook trout tissues. Additional validation tests were also performed on two different freshwater mussel tissues. The percent recovery of each antidepressant (e.g., 25 ng of antidepressant in 200 mg of tissue) was calculated as follows: the ratios of the spiked samples (area analyte / area ISTD) divided by the ratios of the standards previously prepared by spiking set amounts of analytes in the extracted matrix. Satisfactory results of recovery were obtained for all extracted tissues (**Supplementary material, Figure 3-5**).

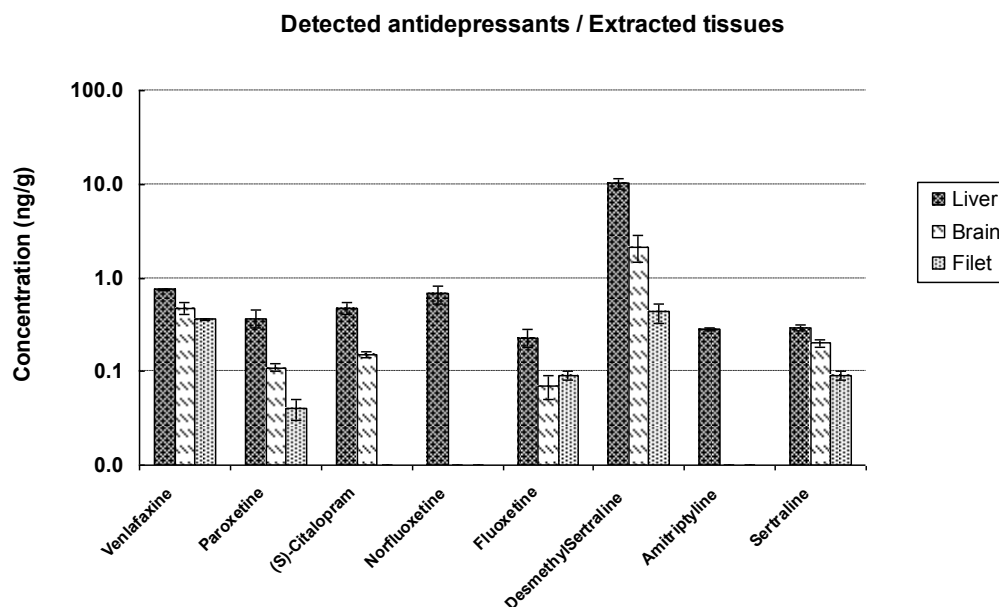
The developed analytical method allowed a sensitive detection for antidepressants in all tissues. Limit of detection (LOD) values were defined as the minimum detectable amount of analyte giving a signal-to-noise ratio (S/N) of 3:1 using the Xcalibur 1.2 software (Thermo Fisher). A mean LOD value of  $10 \text{ pg g}^{-1}$  (variability: 6.7%) was estimated for fish tissues extracts when 200 mg of wet tissue was spiked with 25 ng of each antidepressant. The higher individual LOD % of variability was found with brain tissues samples (SER, up to 19%). However, lower variability was observed with liver tissues

(DSER, 0.5%). Following the same procedure, mean LOQ values were determined by a signal-to-noise ratio (S/N) of 10:1. The LOD and LOQ values are given as **Supplementary material (Tableau 3-4)**. Matrix effects were also investigated on all extracted tissues. To prevent possible losses due to extraction, the ratios of the spiked extracted matrix (25 ng in 200 mg of tissue) minus the ratios of the extracted matrix alone was compared to a 25-ng pure nonextracted standard prepared directly in the mobile phase. For practical purposes, a relative signal response to matrix effects has been reported. Values around 1.0 indicate no appreciable signal suppression or enhancement: results clearly depict limited matrix effects on the overall ion signal of each tissue (**Supplementary material, Figure 3-5**). The highest ion suppression occurred within brain tissue samples (-12% versus pure non-extracted standard solution). In order to overcome possible matrix interference within tissues, standard addition curves were used for quantitation. Furthermore, before each extraction, a standard surrogate (bupropion-*d*<sub>9</sub>) was added to ensure the quality control of the extraction process. Recoveries of 70-120% are normally obtained for standard surrogate; otherwise the overall sequence is rejected. During quantification process, no adjustments were performed for antidepressants against the STD surrogate response. The linearity of antidepressants had been tested across a range of concentrations that was previously reported for pharmaceuticals in fish residues (Ramirez et al., 2007). Hence, the linearity of standard addition calibration curves yielded a correlation coefficient  $r^2 > 0.995$  for a concentration range of 0.50–50 ng per 200 mg of spiked tissue. The mean ratios of two zero points (e.g. extracts alone without any standard addition) in the calibration curve were used to quantify the analytes in each type of tissue.

### *3.3.1.b. Application to fish analysis*

Fish that were exposed to ozone- or primary-treated municipal effluents were sampled and investigated for antidepressants. The occurrence of the antidepressant target molecules in liver, brain, and filet (muscle) tissues was confirmed by observing two

multiple reactions monitoring (MRM) transitions from mass spectrometer (except FLU, NFLU), and also by their respective average retention times ( $t_R$ )  $\pm$  0.20 min. The validated protocol enables the sensitive detection of the eight studied antidepressants using only 100-mg tissue homogenates. The new methodology proved to be a valuable tool in the analytical characterization of antidepressants (e.g., SSRIs, TC) and their metabolites in a variety of biological tissues, especially when the mass of tissues is limited. The relative distribution and concentrations of each detected antidepressant from brook trout exposed to 20% v/v of effluent are represented in **Figure 3-1**.



**Figure 3-1.** Mean concentrations of antidepressant in 100 mg of tissue extracts from brook trout exposed in mesocosms to 20% v/v of effluent at the Montreal WWTP.

As described in the previous section, brook trout were exposed for 3 months in a continuous flow-through setup at the Montreal WWTP to 10 and 20% v/v of renewed effluent. The main goal of using a continuous flow-through system was to simulate the dilution factor retrieved in the receiving water of the St. Lawrence River at 0.3 km and 1

km from the effluent outfall. Others studies were also conducted with this system, using 10 and 20% v/v of effluent previously treated with 15 mg L<sup>-1</sup> of ozone (Hébert et al., 2008). As shown in Table, all studied antidepressants have been detected in final effluent waters used for mesocosm exposition (**Tableau 3-1**).

The extraction procedure was successfully applied to the analysis of all tissue homogenates (**Tableau 3-2**). An extracted ion chromatogram (EIC) of DSER and SER from LC-MS/MS analysis of brook trout exposed to 20% v/v of effluent is shown in **Figure 3-2**. The highest concentrations of antidepressant were retrieved in liver tissues (0.20-10 ng g<sup>-1</sup>) dissected from fish exposed to the less-diluted primary-treated effluent. Other results revealed that up to 2.08 ng g<sup>-1</sup> of DSER was also found in brain tissues from fishes exposed to the same effluent. Therefore, based on those cumulated results after mesocosm exposures, it appears that detected antidepressants could possibly bioaccumulate in aquatic organisms at distances of 0.3 and 1 km from the effluent outfall in the St. Lawrence River. The reported occurrence of antidepressants in the receiving water of the St. Lawrence River (Lajeunesse et al., 2008) strengthened this hypothesis. Whereas our results proved the occurrence of most selected antidepressants in each of the trout tissues, such active drugs may be distributed into similar fish species living in an effluent-dominated stream.

**Tableau 3-1.** Mean concentrations ( $\pm$  Standard deviation) of antidepressants in 20% v/v effluent mesocosm and estimated bioconcentration factor of antidepressants in brook trout.

Compounds	<sup>1</sup> Antidepressant (ng L <sup>-1</sup> ) 20% v/v effluent mesocosm	<sup>2</sup> Bioconcentration Factor (BCF)		
		Liver (n=4)	Brain (n=4)	Filet (n=4)
Desmethylvenlafaxine	55 $\pm$ 3	----	----	----
Venlafaxine	39 $\pm$ 2	18	11	2
Paroxetine	0.96 $\pm$ 0.08	365	198	----
Citalopram	11 $\pm$ 1	39	17	----
Norfluoxetine	0.36 $\pm$ 0.04	1750	----	----
Nortriptyline	0.54 $\pm$ 0.06	----	----	----
Fluoxetine	0.58 $\pm$ 0.02	345	138	224
Desmethylsertraline	0.84 $\pm$ 0.08	12250	2476	500
Amitriptyline	3.7 $\pm$ 0.2	78	----	----
Sertraline	1.1 $\pm$ 0.1	264	191	109

<sup>1</sup> From data Lajeunesse et al. (2008)

<sup>2</sup> BCF: [conc. tissue, ng g<sup>-1</sup>] / [conc. 20% v/v effluent mesocosm, ng L<sup>-1</sup>] x 1000, based on water density of 1.0 g mL<sup>-1</sup>

**Tableau 3-2.** Concentrations of antidepressants retrieved in 100 mg of liver, brain, filet tissue extracts from brook trout exposed in mesocosms to diluted effluents at the Montreal WWTP.

### Liver tissues

Substances	Concentrations (ng g <sup>-1</sup> ) from 100 mg of wet tissue (n = 4)			
	A	B	C	D
Venlafaxine	0.69 ± 0.14	0.16 ± 0.06	0.16 ± 0.02	n/d
Paroxetine	0.35 ± 0.10	0.15 ± 0.05	0.14 ± 0.03	n/d
S-Citalopram	0.41 ± 0.19	n/d	0.06 ± 0.03	n/d
Norfluoxetine	0.63 ± 0.17	0.32 ± 0.10	n/d	n/d
Fluoxetine	0.20 ± 0.06	0.11 ± 0.05	n/d	n/d
Desmethylsertraline	10 ± 1	1.17 ± 0.28	0.06 ± 0.02	n/d
Amitriptyline	0.29 ± 0.07	n/d	n/d	n/d
Sertraline	0.29 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.08	0.10 ± 0.03

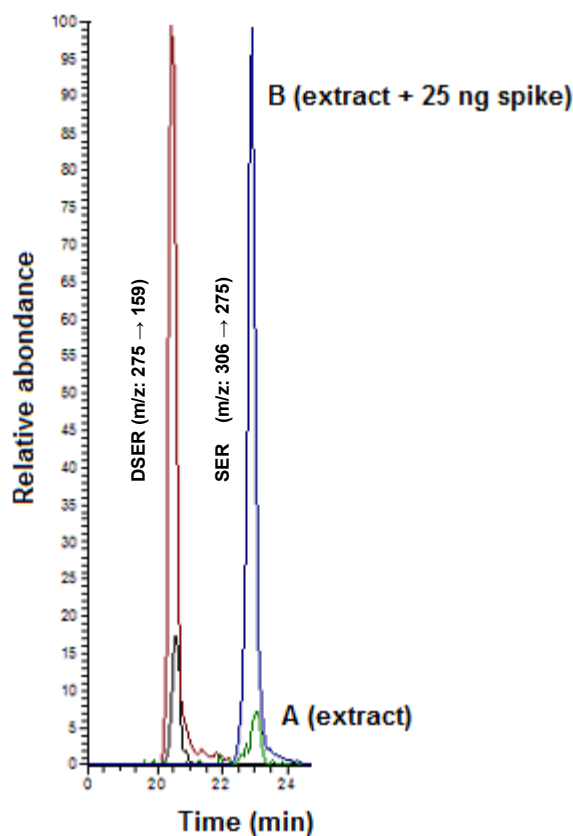
### Brain tissues

Substances	Concentrations (ng g <sup>-1</sup> ) from 100 mg of wet tissue (n = 4)			
	A	B	C	D
Venlafaxine	0.43 ± 0.10	n/d	n/d	n/d
Paroxetine	0.19 ± 0.11	n/d	0.13 ± 0.07	n/d
S-Citalopram	0.18 ± 0.11	n/d	0.06 ± 0.03	n/d
Norfluoxetine	n/d	n/d	n/d	n/d
Fluoxetine	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.05	n/d	n/d
Desmethylsertraline	2.08 ± 0.45	0.78 ± 0.40	0.06 ± 0.02	n/d
Amitriptyline	n/d	n/d	n/d	n/d
Sertraline	0.21 ± 0.08	0.16 ± 0.06	0.04 ± 0.01	< LOQ

### Filet tissues

Substances	Mean concentrations (ng g <sup>-1</sup> ) from 100 mg of wet tissue (n = 4)			
	A	B	C	D
Venlafaxine	0.08 ± 0.03	n/d	n/d	n/d
Paroxetine	< LOQ	n/d	< LOQ	n/d
S-Citalopram	n/d	n/d	n/d	n/d
Norfluoxetine	< LOQ	n/d	n/d	n/d
Fluoxetine	0.09 ± 0.01	0.075 ± 0.03	n/d	n/d
Desmethylsertraline	0.42 ± 0.15	0.29 ± 0.12	0.06 ± 0.02	n/d
Amitriptyline	n/d	n/d	n/d	n/d
Sertraline	0.12 ± 0.03	0.093 ± 0.02	0.05 ± 0.02	< LOQ

A) 20% v/v effluent; B) 20% v/v effluent treated with O<sub>3</sub>; C) 10% v/v effluent; D) 10% v/v effluent treated with O<sub>3</sub>; n/d: Substance not detected below limit of detection LOD; < LOQ: below limit of quantification; DVEN and NTRI not detected.



**Figure 3-2.** Extracted ion chromatogram (EIC) of DSER and SER from LC-MS/MS analysis of brook trout exposed to 20% v/v of effluent: (A) liver tissues extract, and (B) spiked liver tissues extract.

Since bioavailability studies are scarce, only limited comparisons could be made on the occurrence of antidepressants in fish tissue extracts. Indeed, it is somehow difficult to make a direct comparison between two or three different studies because mediums of exposure (e.g. mesocosms, lakes, and rivers), ambient concentrations of antidepressant, exposure time, and fish species might be different. Nevertheless, the concentration of DSER in liver tissue ( $10 \pm 1$  ng g<sup>-1</sup>) was found to be consistent with the observed concentration by Brooks et al. (2005) for three different species of fish in Texas, USA ( $13 \pm$



11 ng g<sup>-1</sup>). However, they reported higher concentrations of FLU ( $1.3 \pm 0.7$  ng g<sup>-1</sup>), NFLU ( $10 \pm 6$  ng g<sup>-1</sup>) and SER ( $3.59 \pm 1.67$  ng g<sup>-1</sup>) when compared to our results (FLU,  $0.20 \pm 0.06$  ng g<sup>-1</sup>; NFLU,  $0.63 \pm 0.17$  ng g<sup>-1</sup>; SER,  $0.29 \pm 0.05$  ng g<sup>-1</sup>). In muscles, similar concentrations of FLU, DSER and SER were detected ( $0.12\text{--}0.42$  ng g<sup>-1</sup>). Recently, Schultz et al. (2010) have reported similar concentration of DSER ( $1.8\text{--}3.0$  ng g<sup>-1</sup>) in brain homogenates from native White Suckers species exposed downstream to discharges of two effluent-impacted streams located in Colorado and Iowa, USA. Another study completed in Ontario (Canada) by Metcalfe et al. (2010) reports on the positive detection of five antidepressants in whole Fathead Minnows species caged at locations downstream of WWTPs. Interestingly, during our bioaccumulation study the *N*-desmethyl metabolites were mostly measured at higher concentrations in the liver tissues than their parent molecules. Schultz et al. (2010) and Brooks et al. (2005) observed the same trends for some antidepressants in different fish species. Nevertheless, results have shown much lower concentrations of antidepressants in fish exposed to disinfected effluent by ozone treatment ( $15$  mg L<sup>-1</sup>). A pilot study conducted at the Montreal WWTP in 2005 and 2006 demonstrated the effectiveness of ozone disinfection on several classes of pharmaceuticals (Gagnon et al., 2008). In fact, a removal rate of 70% was achieved for 6 of the 8 pharmaceuticals detected in the effluent when using an optimal ozone concentration of  $15\text{--}20$  mg L<sup>-1</sup>. Therefore, the remarkable efficiency observed with ozone treatment would certainly decrease the bioavailability of antidepressants to fish exposed to wastewater effluents.

According to our calculated tissue concentrations, the estimated bioconcentration factors (BCFs) for 20% v/v effluent mesocosm (pH: 8.1-8.2) ranged from 2 to 12 250 (Table 1). The highest BCFs were retrieved for liver tissue extracts: DSER (12 250), NFLU (1750), PAR (350), and FLU (345). However, the distribution and bioaccumulation is less important in muscle tissue (e.g. filet) under the experimental pH (ionized species seem to be much more important than nonionized species). Our calculated BCF values for NFLU and FLU were comparable with those reported by Nakamura et al. (2008) after the

exposition of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) at pH 8 over 30 days (NFLU: 3300, FLU: 580). Nevertheless, despite its usefulness, the BCF remained somewhat difficult to calculate. As pointed out by Metcalfe et al. (2010), the origins of metabolites detected in fish tissues could be assigned to direct uptake or by *in vivo* metabolism. Indeed, a metabolism study conducted by Smith et al. (2010) on rainbow trout liver microsomes showed that hepatic FLU metabolism in fish was much less than that seen in mammals and the major mammalian metabolite, NFLU, was possibly not the primary metabolite of FLU in fish. They also suggested that a low level of metabolism could likely be the reason that fish bioaccumulate FLU *in vivo*. These assumptions are consistent with our results and could possibly explain why the metabolite NFLU was detected neither in brain nor in filet tissues. However, the physico-chemical properties of the antidepressants and the water pH seem to play an important role in the molecules distribution (Metcalfe et al., 2010; Nakamura et al., 2008). More data and additional information related to the metabolism and the bioaccumulation would be desirable to clarify the possible environmental pathways of antidepressants along with their metabolites under given pH conditions.

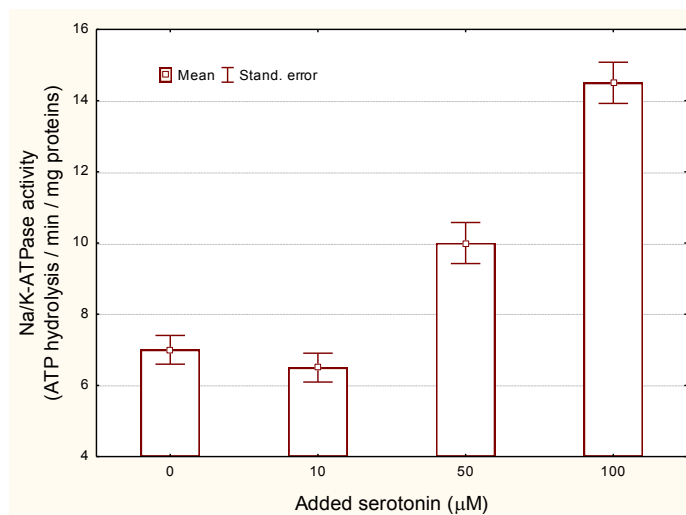
### 3.3.2. Na/K-ATPase activity

In addition to using LC-MS/MS for the quantification of bioaccumulated antidepressants, this paper investigated biomarkers sensitive to this class of pharmaceuticals. The potential toxicological effects of the SSRIs in municipal effluents on brook trout were also examined. First, a methodology for evaluating the activity of serotonin reuptake was developed and optimized by following the rate of Na/K-dependent ATPase activity in synaptosomal membrane vesicles. As depicted in **Figure 3-3A**, the addition of 5 hydroxytryptamine or serotonin (10–100  $\mu$ M) in synaptosomal membrane vesicles induced an increase in ATP hydrolysis, i.e. serotonin stimulation of the ATPase activity clearly maintain the electromotive gradient in synaptosomal membranes.

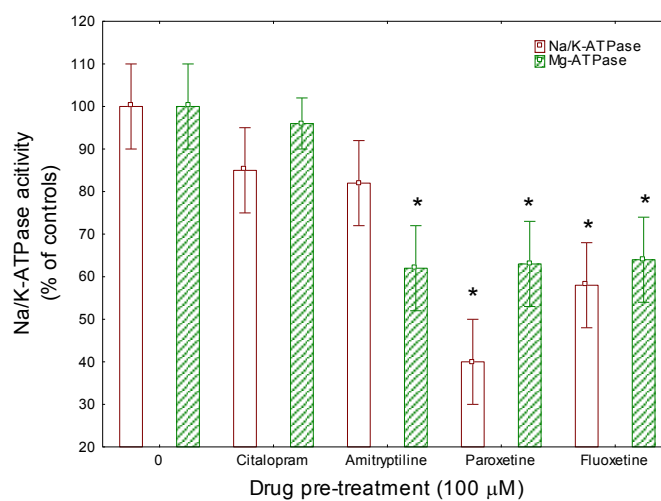
Pre-incubation with selected SSRIs (CIT, AMI, PAR, and FLU) was also able to reduce the activity of the ATP-dependent Na/K-ATPase. To verify the validity of the chosen biomarker, Na/K-dependent ATPase, four SSRIs antidepressants were added in synaptosomal membrane vesicles to block serotonin transport. As expected, Na/K-ATPase activity was decreased by the addition of 100  $\mu$ M of SSRIs to the membrane preparations (**Figure 3-3B**). The reuptake of serotonin at the membrane interface occurs with the efflux of  $K^+$ , which in turn stimulates ATPase to maintain the electroconductive gradient. According to experimental results, the SSRIs reduced Na/K-ATPase activity and PAR and FLU were the most potent ones. In addition, Mg-dependent ATPase activity was also affected by these drugs, but to a lesser extent. Among the four antidepressants tested, PAR was found to be the most potent SSRI for brook trout, followed by FLU and AMI.

Total serotonin and Na/K-ATPase activity was analyzed in brain synaptosomes from trout exposed to primary-treated effluent before and after ozone treatment. Total serotonin content remained constant in fish tissues (ANOVA  $p = 0.24$ ; results not shown). However, the Na/K-dependent ATPase activity was readily inhibited by the municipal effluent before and after ozone treatment (Figure 3-4). Ozone treatment seemed to mitigate this effect, but not completely; Na/K-dependent ATPase activity was still inhibited at 20% v/v effluent dilution. This effect is consistent to the presence of SSRIs in urban effluent. This was further supported by the significant correlation between SSRIs in tissues and Na/K-ATPase in synaptosomes. However, this relationship cannot rule out the possibility that other compounds in effluent might have contributed to the observed responses. Considering the importance of eventually defining a hazard assessment for SSRIs to fish, the reported methodology for measuring toxicological effects caused by antidepressants may represent a promising means of determining whether these changes are linked with drug content in studied tissues. The Na/K dependent ATPase activity was negatively correlated with brain tissue concentrations of FLU ( $r = -0.57$ ;  $p < 0.03$ ), DSER ( $r = -0.84$ ;  $p < 0.001$ ), and SER ( $r = -0.82$ ;  $p < 0.001$ ). These results suggest that the presence of SSRIs in the brain, in part at least, was associated to lower Na/K-ATPase activity in synaptosomal

membranes, which is in agreement with the mode of action of these drugs and the observed responses during the *in vitro* experiments (Figure 3-3). In keeping with biomarkers used for pharmaceuticals in

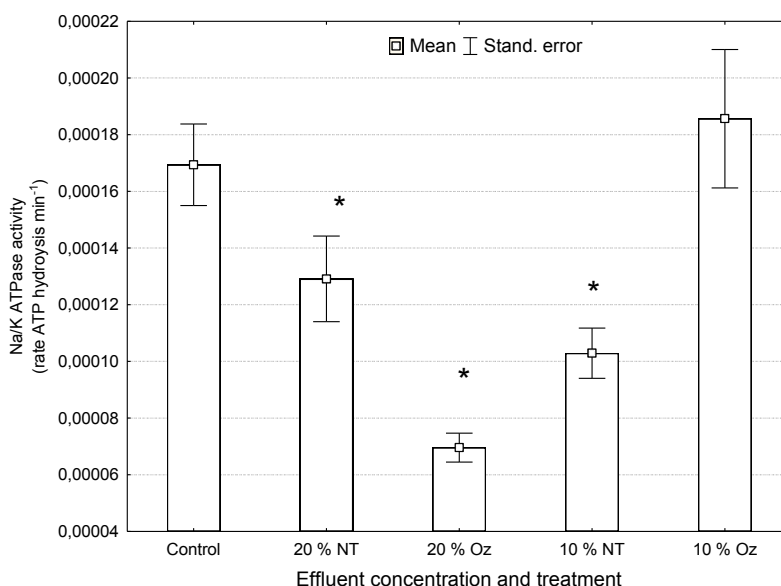


A (n=6)



B (n=6)

**Figure 3-3.** Modulation *in vitro* of Na/K-dependent and Mg-dependent ATPase activity in the brain tissues by selected SSRIs following (A) added serotonin, and (B) pre-treatment with antidepressants.



**Figure 3-4.** Modulation of nerve synapse Na/K-ATPase activity after diluted effluent exposure, n=6 (NT: not treated, Oz: Ozone treatment at 15 mg L<sup>-1</sup>).

the environment (Gagné et Blaise, 2004), physiological biomarkers that respond to the mode of action of drugs and address the toxic consequences are needed in environmental studies. Based on the present study, the Na/K-ATPase activity biomarker was shown to respond to these bioaccumulated SSRIs and other compounds targeting electrolyte balance in membranes. This highlights the need to strengthen the relationships between the presence of serotonergic-like compounds and serotonergic effects in complex environmental mixtures. The data presented for the effluent-exposed fish highlighted the evidence that municipal effluents contained serotonin mimicking compounds (Gagné et Blaise, 2003). Indeed, solid phase C-8 extracts of surface water downstream the same municipal effluent of the present study were capable of activating human serotonin receptors and incubation of female ripe gonads of *Elliptio complanata* to the filtrated municipal effluent, significantly stimulated egg release (Gagné et al., 2004).

### 3.4. Conclusion

A sensitive and rugged LC-MS/MS method has been developed for the simultaneous analysis of antidepressants along with their respective *N*-desmethyl metabolites in limited fish tissues extracts samples. The results reported have supported the observation that antidepressant may accumulate in fish living in an effluent-dominated stream. In the present study, most drug residues partitioned in liver and brain tissues depicting the possibility of distribution in specific tissues. The higher concentrations of antidepressant were observed in liver tissues when the brook trout were exposed to 20% v/v of effluent. Results have shown much lower concentrations of antidepressants in fish exposed to disinfected effluent by ozone treatment (15 mg L<sup>-1</sup>).

Tested SSRIs were shown to reduce the Na/K-ATPase activity in the presence of serotonin in synaptosomal membranes: PAR and FLU being the most potent ones. Brain membrane Na/K-ATPase activity was also reduced in fish exposed to a primary treated effluent before and after ozone treatments showing a similar effect (of SSRIs mode of action). This was further supported by the significant and negative correlation of brain Na/K-ATPase with brain tissue levels of FLU, DSER and SER which suggests that these drugs might have contributed, at least in part, to the observed effects. However, these interesting observations cannot rule out other contaminants given the complex nature of municipal effluents. The combination of tissue loadings and early biological effects provide useful information on potential ecotoxicological impacts of discharged drugs in urban effluents to aquatic life.

### **3.5. Acknowledgements**

The authors thank the city of Montreal for providing access to the mesocosms. Sophie Trépanier from Environment Canada is also acknowledged for her meticulous efforts in the experimental set-up of the mesocosms. Additional thanks are extended to Keltie Purcell from Environment Canada for editing the manuscript. This work was supported by the Chemical Management Plan – Health Canada, the St. Lawrence Action Plan and the Canadian Foundation for Innovation.

## **Supplementary material**



**Tableau 3-3.** Optimized mass spectrometer parameters of antidepressants.

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CID (V)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)
Desmethylvenlafaxine* (DVEN)	264	107, <u>246</u> **	31, 8	10.95
Venlafaxine (VEN)	278	121, <u>260</u> **	22, 8	14.47
Paroxetine (PAR)	330	135, <u>192</u> **	31, 20	15.68
Citalopram (CIT)	325	<u>109</u> **, 262	21, 14	15.76
Norfluoxetine* (NFLU)	296	296	10	16.68
Nortriptyline* (NTRI)	264	191, <u>233</u> **	22, 12	16.98
Fluoxetine (FLU)	310	310	10	17.70
Desmethylsertraline* (DSER)	275	123, <u>159</u> **	37, 10	20.56
Amitriptyline (AMI)	278	191, <u>233</u> **	20, 14	22.28
Sertraline (SER)	306	159, <u>275</u> **	32, 12	22.96
cis-Tramadol <sup>13</sup> -d <sub>3</sub> – Internal STD	268	250	11	12.97
Bupropion-d <sub>9</sub> – Surrogate STD	249	131, <u>185</u> **	27, 11	19.04

\* Known *N*-desmethyl metabolites

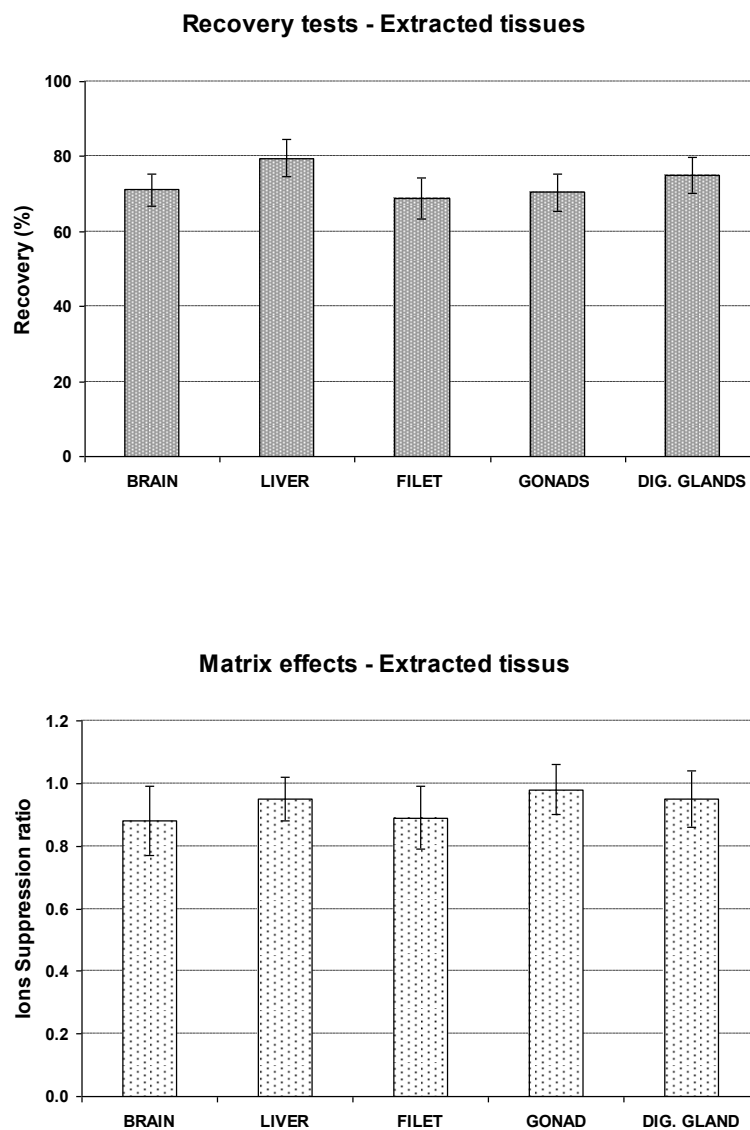
\*\* Selected ion for quantification

**Tableau 3-4.** Estimated limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of antidepressants for fish extracts.

Compound	LOD (pg g <sup>-1</sup> )			LOQ (pg g <sup>-1</sup> )		
	Liver	Brain	Filet	Liver	Brain	Filet
Desmethylvenlafaxine	30	20	20	100	50	50
Venlafaxine	20	10	10	50	40	40
Paroxetine	10	10	10	30	50	60
(S)-Citalopram	3	4	3	10	30	20
Norfluoxetine	3	3	3	10	10	20
Nortriptyline	20	6	3	50	20	10
Fluoxetine	20	3	3	80	10	10
Desmethylsertraline	20	9	9	60	30	30
Amitriptyline	20	20	9	70	50	30
Sertraline	20	9	6	50	30	20

- 1) Fish tissues (liver, brain, and filet).
- 2) Estimated LOD and LOQ values for tissues extracts (n=2) spiked with 25 ng of each antidepressant in 200 mg of wet tissues.

**Figure 3-5.** Mean recoveries (%) of antidepressant and estimated matrix effects (expressed as ion suppression vs. non-extracted standard solution) for 200 mg spiked tissue samples of fish (brain, liver, filet) and mussels (gonad, digestive gland).



### 3.6. Total serotonin level determination by competitive immunoassay

A portion of the brain homogenate was centrifuged at  $15000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes and the supernatant (S15) was collected. Total protein levels were determined according to the method of Bradford (1976) using serum bovine albumin as standard. The levels of serotonin and dopamine were determined in the supernatant (S15) using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In essence, 96-wells luminescence plates (Microlite 2, Thermo Fisher Scientific, Ontario, Canada) were coated with  $0.5\ \mu\text{g}$  of BSA-conjugated dopamine (USbiological, Boston, USA) or  $1\ \mu\text{g}$  of BSA-conjugated serotonin (Advance Targeting systems, San Diego, CA) in  $100\ \mu\text{L}$  of  $50\ \text{mM}$  Tris-HCl, (pH 8.5) at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. After incubation, the plates were washed three times with PBS ( $5\ \text{mM}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $150\ \text{mM}$   $\text{NaCl}$ , pH 7.4) and incubated in blocking buffer (1% dry milk in PBS) for 90 minutes at room temperature with constant shaking. Dopamine and serotonin standards were serially diluted in dilution buffer (0.5% dry milk in PBS) in ranging concentration from 1 to  $1000\ \mu\text{M}$  and 0.5 to  $1000\ \mu\text{M}$  respectively. The plates were washed with PBS and  $50\ \mu\text{L}$  of standards, prediluted samples or dilution buffer were added to the wells followed by an addition of  $50\ \mu\text{L}$  of primary antibody 1:5000 (Rabbit polyclonal to dopamine ab888, Abcam, MA, USA or Rabbit polyclonal to serotonin AB-T03, Advance Targeting systems, San Diego, CA). After 90 minutes of incubation at room temperature with constant shaking, plates were washed 3 times with PBS and incubated with  $100\ \mu\text{L}$  of HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10,000, Stressgen, MI, USA) for an additional hour after unbound HRP-conjugates antibodies were removed. Wells were washed 3 times with PBS and the HRP substrate solution (BM Chemluminescence ELISA Substrate, Roche Diagnostics, Qc, Canada) was then added ( $100\ \mu\text{L}$ ). Chemiluminescence intensity was measured using a Chameleon plate reader (Hidex, Finland). The data were expressed as  $\mu\text{mol}$  (serotonin or dopamine)  $\text{mg proteins}^{-1}$ .

## **Chapitre 4 : Distribution de résidus d'antidépresseurs dans les eaux usées et les boues de traitement suivant l'application de différents procédés de désinfection par des stations d'épuration au Canada**

---

Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada

Lajeunesse A., Smyth S.A., Barclay K., Sauvé S., Gagnon C. 2012.

*Water Res.*, 2012, 46: 5600-5612.

### **Note sur ma contribution**

Ma participation aux travaux de recherche : J'ai réalisé les manipulations, les analyses et l'interprétation des résultats.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires de Dr. Gagnon et du Prof. Sébastien Sauvé, mes directeurs de thèse.

Collaboration des co-auteurs : Shirley Anne Smyth et Kyle Barclay d'Environnement Canada ont réalisé les campagnes d'échantillonnage. Shirley Anne Smyth a également participé à la réalisation de certains calculs statistiques et à la révision du manuscrit.

## Abstract

The fate of 14 antidepressants along with their respective *N*-desmethyl metabolites and the anticonvulsive drug carbamazepine (CAR) was studied in 5 different sewage treatment plants (STPs) across Canada. Using two sensitive and rugged validated LC-MS/MS analytical methods, the concentrations of the different compounds were determined in raw influent, final effluent and treated biosolids samples. Out of the 15 compounds investigated, 13 were positively detected in most 24-h composite raw influent samples. Analysis showed that venlafaxine (VEN), its metabolite *O*-desmethylvenlafaxine (DVEN), citalopram (CIT), and CAR were detected at the highest concentrations in raw influent (up to 4.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  for DVEN). Cumulated results showed strong evidence that primary treatment and trickling filter/solids contact has limited capacity to remove antidepressants from sewage, while activated sludge, biological aerated filter, and biological nutrient removal processes yielded moderate results (mean removal rates: 30%). The more recalcitrant compounds to be eliminated from secondary STPs were VEN, DVEN and CAR with mean removal rates close to 12%. Parent compounds were removed to a greater degree than their metabolites. The highest mean concentrations in treated biosolids samples were found for CIT (1033  $\text{ng g}^{-1}$ ), amitriptyline (768  $\text{ng g}^{-1}$ ), and VEN (833  $\text{ng g}^{-1}$ ). Experimental sorption coefficients ( $K_d$ ) were also determined. The lowest  $K_d$  values were obtained with VEN, DVEN, and CAR (67 to 490  $\text{L kg}^{-1}$ ). Sorption of these compounds on solids was assumed negligible ( $\log K_d \leq 2$ ). However, important sorption on solids was observed for sertraline, desmethylsertraline, paroxetine and fluoxetine ( $\log K_d > 4$ ).

#### 4.1. Introduction

There is a growing concern over the presence of pharmaceutically active compounds (PhACs) in urban wastewater and the aquatic environment (Halling-Sørensen et al., 1998; Daughton et Ternes, 1999). PhACs and their metabolites enter the waste stream after disposal and excretion (Halling-Sørensen et al., 1998; De Vane, 1999) and are not efficiently removed by sewage treatment plants (STPs) where limited removal efficiencies are often observed (Ternes, 1998; Heberer, 2002). Among the most prescribed PhACs throughout the world are the psychiatric drugs that include the family of antidepressants annually dispensed to patients (2007) at more than 22 000 kg in Canada (Calisto et Esteves, 2009; Metcalfe et al., 2010). These neuroactive compounds from the classes of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin noradrenergic reuptake inhibitor (SNaRI) have been detected in surface waters and municipal wastewaters in North America (Kolpin et al., 2002; Vanderford et al., 2003; Schultz et Furlong, 2008; Lajeunesse et al., 2008; Metcalfe et al., 2010; Schultz et al., 2010), Europe and Asia (Lamas et al., 2004; Weigel et al., 2004; Gómez et al., 2006; Himmelsbach et al., 2006), and Scandinavia (Vasskog et al., 2006; Vasskog et al., 2008). Despite the continuous environmental discharge of antidepressants, few data are available on their occurrence, environmental fate, and toxicity either around the world (Fong, 2001; Brooks et al., 2005; Schultz et Furlong, 2008; Schultz et al., 2010; Demeestere et al., 2010) or in Canada (Lajeunesse et al., 2008; Paterson and Metcalfe, 2008; Metcalfe et al., 2010; Lajeunesse et al., 2011). Since the presence of antidepressants in municipal wastewaters could lead to physiological and behavioural effects on aquatic organisms (Fong, 2001; Mennigen et al., 2010b; Lajeunesse et al., 2011; Lazzara et al., 2012), sensitive and reliable analytical methods are therefore needed to monitor such substances in various complex environmental matrices.

The tendency for antidepressants and their metabolites to only be partially removed by STPs contributes in a dependent manner to their constant load in receiving waters and ecosystems at the high  $\text{ng L}^{-1}$  level (Rúa-Gómez and Püttmann, 2012). In addition to

effluent discharges, treated biosolids are now attracting more attention from the scientific community since they are frequently used as fertilizers in agriculture (Ternes et al., 2004). Indeed, the scarcity of current data regarding the chemical constituents in treated biosolids led the U.S. National Research Council (U.S. NRC) to produce a report in 2002. Among the U.S. NRC's recommendations was the need for investigating the occurrence of pharmaceuticals in sewage sludge samples (Jones-Lepp et Stevens, 2007). As yet, much less scrutiny has been given to the environmental fate of pharmaceuticals adsorbed on particulate matter. To date, only a few analytical methods have been published on the extraction of PhACs in wastewater solids samples (raw sludge and treated biosolids) (Ternes et al., 2005; Göbel et al., 2005; Englert, 2007; Carballa et al., 2007; Nieto et al., 2007; Barron et al., 2008; Chenxi et al., 2008; Jelić et al., 2009; Radjenović et al., 2009; Vasskog et al., 2009; Viglino et al., 2011; Bergersen, Hanssen and Vasskog, 2012). These methods are mostly based on liquid chromatography or gas chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, GC-MS/MS) and involve sequential or single-step extraction techniques composed of pressurized liquid extraction (PLE) (Ternes et al., 2005; Nieto et al., 2007), PLE combined to solid-phase extraction (SPE) (Barron et al., 2008; Jelić et al., 2009; Radjenović et al., 2009), and liquid-liquid extraction (LLE) often accompanied with ultrasonic stages (Carballa et al., 2007; Chenxi et al., 2008). However, the majority of the available methods did not include any antidepressant groups in their lists. In fact, only one existing method allowed the extraction of 5 antidepressants (citalopram, sertraline, paroxetine, fluvoxamine, fluoxetine) along with 4 related metabolites (desmethylcitalopram, didesmethylcitalopram, desmethylsertraline, norfluoxetine) in sewage sludge using an adapted extraction method known as hollow fibre supported liquid phase microextraction (HF-LPME or LPME) (Vasskog et al., 2009). Other methods allowed the non-specific extraction of fluoxetine alone (Kinney et al., 2006), fluoxetine and paroxetine (Radjenović et al., 2009), or fluoxetine and carbamazepine (Englert, 2007) in treated biosolids.



Our previous work completed on antidepressants residues in wastewater and surface water has demonstrated the limited capability of a primary treatment process to remove and/or degrade these emerging contaminants (Lajeunesse et al., 2008). Since the fate of antidepressants in wastewater and treated biosolids remained largely unknown, the impact of conventional or advanced wastewater treatment processes also needs to be clarified.

The main goals of this study were three-fold: i) present a novel reliable analytical method for the specific analysis of 14 antidepressants along with their respective *N*-desmethyl metabolites and the antiepileptic drug carbamazepine in treated biosolids samples by LC-MS/MS, ii) estimate the fate of antidepressants in wastewaters and biosolids based on a set of concentration data compiled from a survey at 5 Canadian STPs employing different treatment modes (e.g. primary physicochemical treatment and secondary biological treatment), iii) determine experimental phase partitioning coefficients ( $K_d$ ) of antidepressants and metabolites to better assess the sorption and distribution of such active substances in sewage and biosolids.

## **4.2. Experimental**

### **4.2.1. Chemicals and materials**

Certified standard (> 98% purity grade) fluoxetine (FLU), norfluoxetine (NFLU), paroxetine (PAR), sertraline (SER), (*S*)-citalopram (CIT), fluvoxamine (FLUVO), desmethylfluvoxamine (DFLUVO), mirtazapine (MIR), and desmethyilmirtazepine (DMIR) were provided by Toronto Research Chemical Inc. (North York, Ontario, Canada). Desmethylertraline (DSER), venlafaxine (VEN), *O*-desmethylvenlafaxine (DVEN), and bupropion-*d*<sub>9</sub> (BUP) were obtained from Nanjing Jinglong PharmaTech (Nanjing, China). Amitriptyline (AMI), nortriptyline (NTRI), carbamazepine (CAR), and 10,11-dihydrocarbamazepine (DHC) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis,

Missouri, USA), while cis-tramadol<sup>13</sup>C-*d*<sub>3</sub> (TRA) was purchased from Cerilliant Corp. (Round Rock, Texas, USA). The high-performance liquid chromatography–grade solvents (methanol and acetonitrile) and ammonium hydroxide were provided by Caledon Laboratories Ltd. (Georgetown, Ontario, Canada). Reagent-grade hydrochloric acid, acetic acid, ammonium bicarbonate, and ACS grade ethyl acetate were provided by American Chemicals Ltd. (Montreal, Quebec, Canada). Solid-phase extraction (SPE) cartridges of 6 mL, 200 mg Strata<sup>TM</sup>X-C were purchased from Phenomenex (Torrance, California, USA). Stock solutions of 100 mg L<sup>-1</sup> of each substance were prepared in methanol and stored at 4°C in amber glass bottles. Target antidepressants were selected due to their occurrence and ubiquity in the aquatic environment in aquatic environment, according to the information found in literature reported, as well as their high human consumption in Canada. All corrosive and pure standard chemicals were handled carefully under a ventilated fume hood wearing appropriate protection.

#### **4.2.2. Instrumentation**

Liquid chromatography (LC) was performed using an Agilent 1200 Series LC system equipped with binary pumps, degasser, and thermostated autosampler maintained at 4°C. The antidepressants were separated on a Kinetex XB-C18 column (100 mm x 2.10 mm, 1.7 µm) using a binary gradient made of (A) ammonium bicarbonate (5 mM) pH 7.8, and (B) acetonitrile at a flow rate of 400 µL min<sup>-1</sup>. The volume of injection was 15 µL for raw influent, final effluent, and sludge extracts. The gradient used was (%B): 0 min (10%), 6 min (80%), 10 min (80%), 12 min (90%), 14 min (10%), and 15 min (10%). An equilibration time of 5 min was used resulting in a total run time of 20 min. The column temperature was maintained at 40°C.

For quantitative analysis, the LC system was coupled to a 6410 triple quadrupole mass spectrometer (QQMS) manufactured by Agilent Technologies (Santa Clara, CA,

USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The capillary was maintained at 4000 V, and the cone voltage was optimized for each compound in the positive-ion mode (ESI+). Additional parameters were held constant for all antidepressants: gas temperature 325°C; gas flow 10 L min<sup>-1</sup>; nebulizer 35 psi, dwell time 50 ms. The MassHunter software from Agilent Technologies was used for data acquisition and processing. Optimized parameters are listed in **Tableau 4-5 (Supplementary material)**.

#### **4.2.3. Samples collection and preparation**

All samples were collected as part of a national wastewater monitoring program between March 2009 and April 2010 from 5 different STPs across Canada. Specifications and details of the selected STPs (treatment type, average flows, population served, etc.) are reported in table (**Tableau 4-1**). Typically, 24-h equal-volume composite samples (400 mL every 30 minutes) of raw influent and final effluent were collected at each STPs using HACH Sigma 900 refrigerated autosamplers (HACH Company, Loveland CO, USA) and shipped on ice to Montreal (QC, Canada) on the same day in polyethylene containers (Systems Plus, Baden, ON, Canada).

Treated biosolids are the product of the solids treatment train within the STP. Suspended solids settle in the primary and secondary clarifiers and are periodically pumped to the solids treatment train, which was anaerobic digestion for all STPs in this study. Anaerobic digestion typically has a retention time of 15 to 20 days (Tchobanoglous et al., 2004), thus providing opportunity for mixing and equalization. Since the treated biosolids are already “composited” by the nature of the treatment process, grab samples of liquid or dewatered treated biosolids were collected into polyethylene containers (Systems Plus, Baden, ON Canada) and immediately shipped on ice to Montreal’s laboratories.

Aqueous samples were filtered following the same filtration procedure described by Lajeunesse et al. (2008) and stored in the dark at 4°C for less than 24-h until extraction. This short delay has been shown to prevent degradation of most pharmaceuticals (Aboufald et al., 2010). Treated biosolids samples (~10 g of material) were frozen and then freeze-dried for 2 days in a FreeZone Triad model 7400040 lyophilizer (Labconco, Kansas City, MO, USA) and stored at -80°C until use. For liquid biosolids samples received from STP B, around 10 g of wet material were filtered with a 0.7 µm microfiber filter. The filtered biosolids were then frozen, freeze-dried, and stored at -80°C.

#### **4.2.4. Sample extraction**

##### *4.2.4.a. Aqueous sewage samples*

The extraction method for raw influent and final effluent water samples was based on our previous published method (Lajeunesse et al., 2008). However, we decided to incorporate the neutral drug carbamazepine (CAR) among the basic antidepressants which required us to modify the previous protocol, i.e the strong cation exchange cartridges (Strata SCX, Phenomenex) were replaced with mixed-mode cartridges (Strata X-C, Phenomenex).

**Tableau 4-1.** Main characteristics of the studied sewage treatment plants.

Plant	Population Served	Wastewater treatment types	Average flow (m <sup>3</sup> d <sup>-1</sup> )	SRT (d)	HRT (hr)	Solid treatment process	Date sampling	Process Temp. (°C)	Influent pH	Influent TSS (mg L <sup>-1</sup> )	Effluent removal BOD (%)	Effluent removal COD (%)	Nitrification?
B	650 000	- Secondary (biological nutrient removal)	400 000	7.5	23.0	Digestion (mesophilic, anaerobic) lagoon settling	Sept. 2009	21.2	7.59	193	97.1	92.0	Yes
				18	26.7		Apr. 2010	11.3	7.22	122	96.0	88.4	Yes
L	110 000	- Secondary (biological aerated filter)	60 000	Not applicable	5.0	Digestion (mesophilic, anaerobic) dewatering centrifuge	Aug. 2009	13.5	7.52	138	97.0	87.1	Yes
					6.8		March 2009	13.5	6.74	161	83.9	68.2	Yes
A	900 000	- Secondary (trickling filter/solid contact)	450 000	Not applicable	10.8	Digestion (thermophilic, anaerobic) dewatering centrifuge	Jul. 2009	21.0	7.01	176	94.5	83.9	No
W	375 000	-Secondary (activated sludge)	226 000	3.6	12.6	Digestion (mesophilic, anaerobic) dewatering centrifuge	Aug. 2009	20.3	7.58	185	98.3	86.7	Yes
N	75 000	-Primary (chemical: alum, ferric chloride)	28 000	Not applicable	2.4	Digestion (mesophilic, anaerobic) dewatering centrifuge	Jul. 2009	22.7	7.01	266	54.2	56.2	Not applicable

SRT: solids retention time, HRT: hydraulic retention time, TSS: Total suspended solids, BOD: Biochemical oxygen demand, COD: Chemical oxygen demand.

To each 250 mL of filtered sewage sample, we added 100  $\mu\text{L}$  of a surrogate standard solution prepared in methanol (bupropion- $d_9$  / 10,11-dihydrocarbamazepine, 2.5  $\text{mg L}^{-1}$ ) and 2.5 mL of methanol before lowering the pH to around 3 with 100  $\mu\text{L}$  of phosphoric acid (85%). The mixed-mode solid phase extraction (SPE) cartridges Strata X-C were conditioned with 4 mL of methanol followed by at least 8 mL of Milli-Q water. SPE was performed with a VAC ELUT SPS24 manifold (Varian) at flow rates  $\sim 10\text{--}15 \text{ mL min}^{-1}$ . After extraction, all cartridges were washed with 2 mL of HCl (0.1M). CAR was then eluted with 2 x 2 mL of ethyl acetate prior to the evaporation of the tubes to dryness under a gentle stream of nitrogen. Meanwhile, all SPE cartridges were washed with 2 mL of methanol. The antidepressants retained onto the sorbent were then eluted with 2 x 2 mL of a solution of 5% (v/v)  $\text{NH}_4\text{OH}$  in methanol. The combined fractions (e.g. CAR and antidepressants) were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of a solution of cis-tramadol<sup>13</sup>- $d_3$  in methanol (5  $\text{mg L}^{-1}$ ) as the internal standard and evaporated to dryness with nitrogen. The dried extracts were then reconstituted with 0.50 mL of the mobile phase solution of ammonium bicarbonate (5 mM) pH 7.8 – acetonitrile (1:1 v/v) and injected in LC-QqQMS for analysis.

#### 4.2.4.b. Treated biosolids samples

A new protocol has been developed for the simultaneous extraction of CAR and antidepressants in treated biosolids samples. In a 16 x 150 mm borosilicate glass screw-top conical tube, 0.200 g of freeze-dried sludge is transferred before adding 8 mL of a solution composed of methanol / 0.1 M acetic acid buffer solution pH 4.0 (1:1 v/v). To each tube we added 100  $\mu\text{L}$  of a surrogate standard solution prepared in methanol (bupropion- $d_9$  / 10,11-dihydrocarbamazepine, 2.5  $\text{mg L}^{-1}$ ). Samples were then shaken vigorously and mixed on a rotary extractor (Caframo REAX) for 15 min. After extraction, tubes were placed in a sonication bath for 15 min before adding 4 mL of Milli-Q water to each tube. The new diluted solutions were then centrifuged at room temperature (320 x g) for 5 min. Following the SPE protocol described in the previous section for aqueous sewage samples, supernatants were transferred directly to mixed-mode Strata X-C SPE cartridges. The final extracts were reconstituted in 0.5 mL of the mobile phase solution of ammonium

bicarbonate (5 mM) pH 7.8 – acetonitrile (1:1 v/v), filtered with a PTFE 0.45  $\mu\text{m}$  filter, and then injected in LC-QqQMS system for analysis.

#### 4.2.5 Methods validation

##### 4.2.5.a. Aqueous sewage samples

The addition of CAR with two other antidepressants along with their respective metabolites (fluvoxamine - FLUVO, desmethylfluvoxamine - DFLUVO, mirtazepine - MIR, desmethyilmirtazepine - DMIR) necessitated the completion of a new process to validate the suitability of the analytical method in real sewage samples. Similarly to our previous method (Lajeunesse et al., 2008), recovery tests were performed on spiked samples to determine the precision and the accuracy of the method. Because the analytes can be found in sewage samples, standard addition experiments were completed to determine the recoveries of all substances. The recovery rate of drugs spiked into each type of water (nominal concentration: 500  $\text{ng L}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) was calculated as the ratios of the spiked samples (area analyte / area ISTD) divided by the ratios of the 500  $\text{ng L}^{-1}$  standards used in the addition calibration curve prepared by spiking set amounts of analytes in the extracted matrix. The instrumental limit of detection (LOD) was evaluated as 3.3 ( $S_0 / m$ ), where  $S_0$  is the standard deviation of a regression curve (standard error conversed to standard deviation) and  $m$  the slope value from the standard addition calibration curve (Lajeunesse et al., 2008; Hayashi et al., 2005). The instrumental limit of quantification (LOQ) was estimated using  $\text{LOQ} \times 3.33$ . Matrix effects and linearity were also investigated following the same steps described in Lajeunesse et al. (2008). Matrix effects were investigated on influent and effluent samples. To prevent possible losses due to extraction, the ratios of the spiked standards (500  $\text{ng L}^{-1}$ ,  $n=3$ ) minus the ratios of the extracted matrix alone (standards used in the addition calibration curve) was compared to the ratio of a 500  $\text{ng L}^{-1}$  non-extracted standard prepared directly in the mobile phase. Hence, the % signal response to matrix effects was calculated by dividing the signal obtained from a spiked

sample in the matrix (spl. spiked) versus the signal of a pure non-extracted standard (pure std.) entered in formula  $[1 - (\text{spl. spiked} / \text{pure std.})] \times 100$ . To ensure good quality control of the entire extraction process, some blank samples were incorporated in each sequence. Moreover, surrogate standards of bupropion- $d_9$  and 10,11-dihydrocarbamazepine ( $500 \text{ ng L}^{-1}$ ) were added at the beginning of each extraction.

#### *4.2.5.b. Treated biosolids samples*

During the validation process, standard addition experiments were completed to determine the recoveries of all substances. Similarly to aqueous sewage samples, exact weighted samples ( $0.200 \text{ g}$ ) of dried biosolids were spiked with a standard solution containing all studied compounds at a nominal concentration of  $25 \text{ ng}$ . The recovery rate of drugs spiked into sewage sludge samples was calculated as the ratios of the initial spiked samples (area analyte / area ISTD) divided by the ratios of the  $25 \text{ ng}$  standards used in the addition calibration curve prepared by spiking set amounts of analytes in the extracted matrix. Conventional tests recovery, LOD, matrix effects, and linearity (six point calibration curves,  $0.5 - 500 \text{ ng g}^{-1}$ ) were determined in treated biosolids samples. To ensure good quality control of the entire extraction process, the same precautions as aqueous sewage samples were applied in a regular basis at the beginning of each extraction.

### **4.3. Results and discussion**

#### **4.3.1 Validation tests**

##### *4.3.1.a. Aqueous sewage samples*



Following our first antidepressant study related to their occurrence in raw influent and final effluent (Lajeunesse et al., 2008), two additional antidepressants along with their respective *N*-desmethyl metabolites and the anticonvulsive drug CAR were added to the initial list of compounds. Thus, the existing protocol has been modified to enable the simultaneous extraction of both neutral and basic substances. In order to reach that goal, we used a SPE cartridge containing a polymeric resin that has been functionalized with polar and strong cation exchange groups capable of exhibiting numerous retention mechanisms including hydrophobic, hydrogen bonding,  $\pi$ - $\pi$ , and ion exchange (Huq et al., 2003). Throughout the numerous experiments, satisfactory levels of analyte recovery were achieved with the mixed-mode Strata X-C cartridges (effluent:  $72 \pm 4\%$  to  $102 \pm 1\%$ , raw influent:  $73 \pm 4$  to  $98 \pm 5\%$ ). Recovery values were considered acceptable (**Tableau 4-2**), and were similar to previous results (Lajeunesse et al., 2008).

The calculated LOD and estimated LOQ values showed the high sensitivity of the modified method. The LOD values ranged from 0.01 to 0.2 ng L<sup>-1</sup> and 0.03 to 0.4 ng L<sup>-1</sup> for effluent and influent respectively (**Tableau 4-2**). Additional validation tests were completed to evaluate the matrix effects. The results expressed as percent suppression or enhancement revealed moderate signal suppression for effluent (mean value: -31%) and influent (mean value: -44%). Matrix effects of each substance were depicted in **Figure 4-5A (Supplementary material)**. For linearity, calibration standards ranged from 0.5 to 2000 (equivalent to aqueous concentrations, volume of 250 mL) and yielded  $r^2 > 0.99$  in spiked matrix. During routine analysis, standards in the lower end of the validated range were used to generate calibration curves for less concentrate compounds, and the intercept was not forced through zero. The instrumental precision of the method was also determined by repeated intra-day analysis (five successive injections of one extract previously spiked at a nominal concentration of 500 ng L<sup>-1</sup>). The results of each substance for effluent and influent expressed as percent relative standard deviation (% RSD) were included in table (**Tableau 4-2**).

**Tableau 4-2.** Validation tests results for final effluent, raw influent, and treated biosolids: recoveries, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), and instrumental precision of the method.

Compound	Final Effluent				Raw influent				Treated biosolids			
	Recovery (%)	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	Precision RSD (%)	Recovery (%)	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	Precision RSD (%)	Recovery (%)	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	Precision RSD (%)
DVEN	95 ± 1	0.1	0.3	2.0	98 ± 1	0.1	0.4	3.4	79 ± 9	0.2	0.5	1.5
DFLUVO	95 ± 2	0.02	0.06	3.7	89 ± 2	0.07	0.2	4.1	66 ± 6	0.2	0.8	5.0
VEN	97 ± 2	0.04	0.1	1.4	98 ± 2	0.1	0.4	7.4	101 ± 6	0.2	0.5	0.8
MIR	95 ± 2	0.1	0.3	4.8	92 ± 1	0.1	0.3	4.0	85 ± 7	0.07	0.2	1.8
CIT	97 ± 2	0.1	0.4	5.9	95 ± 3	0.1	0.4	3.9	79 ± 12	0.3	1.1	3.1
BUP	102 ± 1	---	---	4.3	95 ± 3	---	---	5.1	69 ± 5	---	---	4.1
FLUVO	91 ± 2	0.1	0.3	5.3	88 ± 1	0.4	1.4	5.4	95 ± 17	0.3	0.9	2.2
PAR	72 ± 4	0.1	0.3	5.1	73 ± 4	0.1	0.3	7.7	63 ± 10	0.04	0.1	2.3
NFLU	96 ± 2	0.1	0.3	4.3	98 ± 5	0.1	0.4	4.6	61 ± 9	0.5	1.7	7.6
NTRI	92 ± 1	0.03	0.1	5.0	89 ± 1	0.05	0.2	8.6	45 ± 5	0.2	0.8	3.2
DSER	93 ± 2	0.1	0.3	2.7	94 ± 5	0.2	0.7	8.5	44 ± 6	0.1	0.4	3.3
FLU	93 ± 1	0.2	0.7	3.9	85 ± 6	0.3	0.7	4.4	98 ± 10	0.1	0.4	3.1
CAR	91 ± 2	0.03	0.1	1.1	88 ± 6	0.2	0.6	8.3	71 ± 7	0.05	0.2	4.8
AMI	88 ± 2	0.01	0.04	5.9	87 ± 3	0.03	0.1	5.0	98 ± 14	0.04	0.1	2.8
SER	90 ± 1	0.01	0.04	4.1	86 ± 5	0.1	0.4	8.4	60 ± 6	0.2	0.8	1.1
DHC	91 ± 1	---	---	3.3	85 ± 5	---	---	4.6	72 ± 3	---	---	3.6
DMIR	84 ± 3	0.07	0.2	3.2	86 ± 4	0.1	0.3	9.0	62 ± 8	0.1	0.4	2.6

#### 4.3.1.b. Treated biosolids samples

Since there are very few analytical methods on the specific extraction of antidepressants in treated biosolids samples, limited comparison could be made on validation results. However, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) published in 2007 a validated method for the detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in soils, sediments, and biosolids (Englert, 2007). Despite the high amount of sample required for the extraction (1 g), the method involving sequential techniques of liquid-liquid extraction with acetonitrile and SPE enabled good recovery values for CAR ( $92 \pm 19.3\%$ ) and fluoxetine (FLU) ( $101 \pm 20\%$ ). Also, Radjenović et al. (2009) have reported CAR, FLU and paroxetine (PAR) recovery values of respectively  $84.3 \pm 1.8\%$ ,  $15.7 \pm 0.6\%$  and  $59.0 \pm 0.1\%$  for spiked secondary sludge samples using pressurized liquid chromatography (PLC) and SPE cartridges. During our experiment, recoveries of  $71 \pm 7\%$ ,  $97 \pm 10\%$  and  $63 \pm 10\%$  were obtained from individual triplicates extracts for the same compounds (**Tableau 4-2**). Other recoveries were also reported elsewhere for CAR using PLC-SPE ( $120 \pm 15\%$ ,  $134 \pm 4\%$ ) (Barron et al., 2008; Jelić et al., 2009) and liquid-liquid extraction (LLE) with ultrasonic stages ( $72 \pm 1\%$ , 74-96%) (Carballa et al., 2007; Chenxi et al., 2008). To overcome matrix effects caused by coextracted organic matter from the matrix, standard addition calibration curves with internal standard (ISTD) were used throughout the study. Despite the efficient purification steps integrated in the protocol, all compounds are affected by matrix effects (mean values: -45%). As shown in **Figure 4-5B (Supplementary material)**, validation tests revealed comparable matrix effects between primary and secondary sludge extracts the most suppressed substance was FLU (-90%). Similar matrix effects in sewage solids were observed by other researchers during LC-MS/MS analysis with electrospray ionisation mode (ESI) (Barron et al., 2008; Jelić et al., 2009; Radjenović et al., 2009). Among other tested parameters were the linearity range and the sensitivity (e.g. LOD, LOQ) of the method. Calibration curves gave very good fits ( $r^2 > 0.99$ ) over the targeted range of 0.5- 500 ng g<sup>-1</sup> in spiked matrix. For real sample analysis, standards in the lower end of the validated range were used to generate calibration curves for less concentrate compounds, and the intercept was not forced through zero. The LOD

values in sludge were lower than  $0.2 \text{ ng g}^{-1}$  for most analysed compounds. The developed method was sufficiently sensitive for the detection and quantification of all antidepressant residues in treated biosolids samples. Estimated LOQ for CAR ( $0.2 \text{ ng g}^{-1}$ ), FLU ( $0.4 \text{ ng g}^{-1}$ ) and PAR ( $0.1 \text{ ng g}^{-1}$ ) were consistent with LOQ values reported by Radjenović et al. (2009) (CAR:  $0.8 \text{ ng g}^{-1}$ , FLU:  $1.2 \text{ ng g}^{-1}$ , PAR:  $0.7 \text{ ng g}^{-1}$ ). However, higher LOQ values were reported in the U.S. EPA method (Englert, 2007) for CAR ( $1.6 \text{ ng g}^{-1}$ ) and FLU ( $2.8 \text{ ng g}^{-1}$ ).

#### 4.3.2. Antidepressants in wastewater

In addition to the uncertainty and variability associated with analytical measurements, as described above, there are several sources of uncertainty in the collection and preparation of samples for analysis. The sampling volume and frequency was chosen based on a procedure used for a previous study (Lishman et al, 2006), with an increase in frequency to improve representativeness (every 30 minutes rather than every 1 hour). As discussed by Ort et al (2010), even this sampling frequency may not be sufficient to capture the variability in sewage composition over the 24-hour sampling period. Additionally, the influent and effluent composite samples were collected concurrently, with no allowance for the hydraulic retention times (HRTs) of the treatment systems. The analytical method required the removal of suspended solids, as described above; therefore the reported concentrations only reflect analytes present in the dissolved phase. These sources of uncertainty influence the degree to which analytical results can be interpreted.

In the present study, the fate of antidepressants and their respective *N*-desmethyl metabolites was determined in 5 Canadian STPs employing different treatment processes (e.g. primary and secondary treatments). The STPs were operating normally during all sampling events, and achieved typical removals of Biochemical Oxygen Demand (BOD) and Total Suspended Solids (TSS) (**Tableau 4-1**). BOD removal was higher in summer at

STPs L, A, and W. TSS removal was higher in summer at STPs A and N. Of the 15 compounds investigated, 13 were positively detected in most 24-h composite raw influent samples. Analysis of drug extracts in wastewater showed that venlafaxine (VEN), its metabolite *O*-desmethylvenlafaxine (DVEN), citalopram (CIT), and the anticonvulsive CAR were detected at the highest concentrations. Hence, up to  $4.2 \mu\text{g L}^{-1}$  were reported for DVEN at STP N. The concentrations of all studied substances analysed with 6 replicates are compiled in table (**Tableau 4-3**). The antidepressant FLUVO and its direct metabolite DFLUVO were detected in both raw influent and final effluent samples only from STP B at mean concentrations ranging from  $3.9$  to  $12 \text{ ng L}^{-1}$ . A representative FLUVO chromatogram of a raw influent sample for two extracted multiple reactions monitoring (MRM) transitions is shown in **Figure 4-1**. As reported in a previous study, FLUVO is suspected to have potent effects on molluscs (zebra mussels) by inducing spawning at the low  $\text{ng L}^{-1}$  range for male specimens (Fong, 2001). However, the environmental concentration of FLUVO is expected to be low since only  $< 4\%$  of the parent drug is believed to be excreted in urine in an unchanged form accompanied with at least 11 biotransformation by-products (De Vane, 1999). The concentrations of certain antidepressants and metabolites in wastewaters were generally consistent with other studies conducted in North America (MacLeod et al., 2007; Lajeunesse et al., 2008; Schultz et Furlong, 2008; Metcalfe et al., 2010).

Estimated of removal of compounds from wastewaters was calculated as  $([\text{Influent}] - [\text{Effluent}]) / [\text{Influent}] \times 100$ . An overview of the summarized results reported in table (**Tableau 4-3**) revealed that moderate removal rates were obtained for most antidepressants in all studied STPs. The more recalcitrant compounds were VEN, DVEN and CAR with removal rates generally  $< 20\%$ . Both the treatment process and the physicochemical properties of the molecules play an important role in the overall removal efficiencies. As such, we can not rule out that calculated removal rates  $\leq 15\%$  for DSER, VEN, DVEN, CAR, FLU, and NFLU were always significant when accounting for the sampling and analytical uncertainties. Throughout the study, constant recoveries were obtained with the

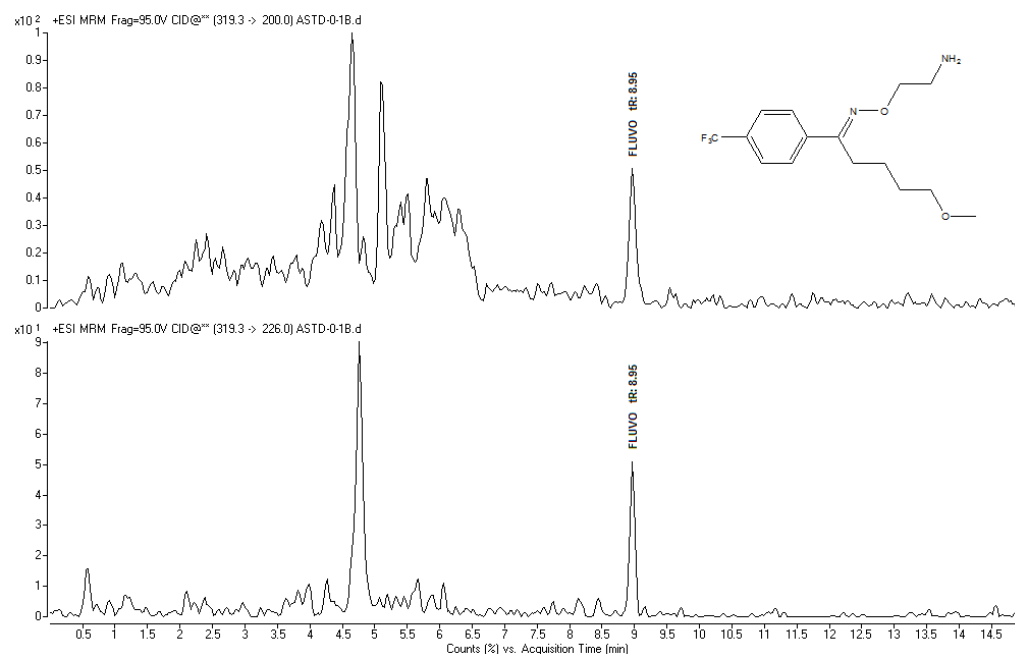
surrogate standard (80-120%) in each sequence of injection confirming the quality of the extraction process. As depicted in **Figure 4-2**, antidepressants were removed better from STP B (secondary treatment, biological nutrient removal – BNR) than from STP N (primary treatment, chemically enhanced). The poorer removal from primary treatment indicates that other mechanisms besides chemical adsorption are required to efficiently remove antidepressants. Biological treatment processes (trickling filter/solids contact (TFSC), activated sludge, biological aerated filter (BAF), and BNR) have the advantages of providing both biodegradation and adsorption of the compounds to the sludge. In secondary treatments, the main sorption mechanisms are the adsorption onto bacterial lipid structure, the sorption onto polysaccharides (outside of bacterial cells), and the chemical binding to bacterial proteins and nucleic acids (Jones et al., 2006). A Mood's Median test on the removal data sets from each STP in summer indicated that STPs N and A achieved the lowest removals (median 8.0 and 8.8% respectively) while STPs B, L and W achieved higher and similar removals (median 32, 37 and 38% respectively). Many factors including solids retention time (SRT), organic load, microbial community, raw sewage temperature and pH have been shown to have pronounced effects on the efficiency of activated sludge treatments (Wick et al., 2009; Oulton et al., 2010; Deegan et al., 2011). As such, the significant variation in effluent temperature for STP B (t-test,  $p < 0.0001$ ) during each sampling campaign gave different results in terms of removal rates for samples taken in the middle of September (end of summer) and middle of April (end of winter). These results are illustrated in **Figure 4-3**. The biological process of STP B at 11.3°C was found to be 11% less efficient to remove antidepressants in raw sewage than it was at 21.2°C. The process also showed a decrease in removal percentage of chemical oxygen demand (COD %) of -3.8% from warmer to colder operating conditions (Table 1). Similar seasonal variation of pharmaceuticals removal was also reported with respect to biological processes (CAS and BNR) from STPs located in Beijing (China) (Sui et al., 2011). The results revealed that the concentrations of PhACs were lower in effluents in the summer compared to the winter season.

Another aspect that could influence the removal efficiency of antidepressants is the configuration of the different STPs. Among the studied secondary processes, the BNR process at STP B includes nitrification (aerobic conditions), denitrification (anoxic conditions), and biological phosphorus removal (anaerobic conditions). Since these processes take place in different redox and microbial environments, these conditions may contribute to the decomposition of antidepressants. In contrast, STP A, with similar population and flow, is a wholly aerobic TFSC process with a shorter HRT. As illustrated in **Figure 4-4**, the BNR conditions showed better removal rates. With respect to removal of COD, a variation of 8.8% was also noticed between the two STPs (**Tableau 4-1**). Among all the tested secondary biological processes, the best efficiency was obtained with STP L (BAF) with a mean removal rate averaging 42%. Although plant A also uses a biological process (TFSC), its ability to remove these compounds is much lower than the other 3 biological processes. Plant A also showed less ability to remove estrogens in a previous study (Servos et al, 2005). Since it is not possible to describe some of the studied biological processes by SRT, removals of anti-depressants at the 4 secondary plants were compared by HRT. Plants B, W and L showed similar overall removals as noted above, and had summer HRTs of 23 h, 13 h, and 5 h respectively. Plant A had a summer HRT of 11 h and showed the lowest removal, indicating that the nature of the biological process is more important than the simple retention time. Experimental evidence published by other research teams clearly demonstrates that current limitations in conventional treatment practices can be overcome with advanced treatment strategies including chemical oxidation with ozone or the use of membrane technologies (Oller et al., 2011).

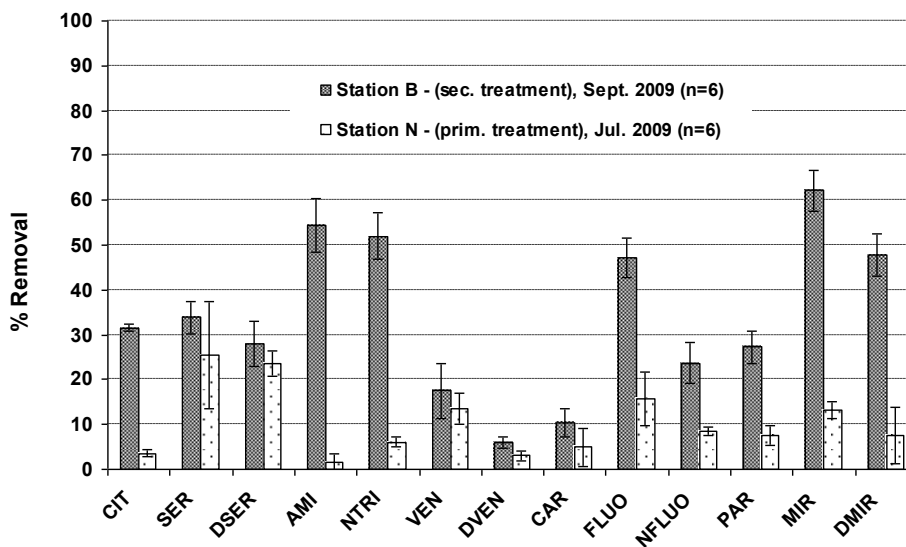
**Tableau 4-3.** Mean (n=6) concentrations of the antidepressants and metabolites detected in different Canadian STPs along with corresponding removal efficiency (eff. %).

		Compound concentrations in ng L <sup>-1</sup> (standard deviation), n=6														
STPs		CIT	SER	DSER	AMI	NTRI	VEN	DVEN	CAR	FLU	NFLU	PAR	MIR	DMIR	FLUVO	DFLUVO
B	Sept. 09	Influent	326 (34)	12 (1)	19 (2)	283 (26)	27 (2)	1769 (169)	3326 (368)	1032 (69)	16 (3)	10 (3)	16 (6)	70 (2)	6.9 (1.8)	5.1 (2.3)
		Effluent	223 (22)	8.1 (0.4)	14 (2)	128 (7)	13 (2)	1454 (75)	3131 (365)	923 (36)	8.6 (0.8)	7.6 (2.2)	12 (5)	27 (3)	3.6 (1.2)	2.9 (1.1)
		Eff. (%)	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>28</b>	<b>54</b>	<b>52</b>	<b>18</b>	<b>5.9</b>	<b>10</b>	<b>47</b>	<b>24</b>	<b>27</b>	<b>62</b>	<b>48</b>	<b>43</b>
	Apr 10	Influent	302 (27)	7.6 (0.7)	15 (5)	142 (4)	16 (2)	1621 (176)	3093 (407)	957 (64)	10 (4)	11 (1)	6.7 (0.9)	80 (11)	15 (1)	5.3 (1.8)
		Effluent	219 (10)	5.7 (1.1)	12 (4)	87 (9)	11 (1)	1432 (153)	3007 (512)	914 (72)	6.6 (2.6)	10 (1)	5.0 (0.5)	43 (2)	10 (1)	3.9 (1.1)
		Eff. (%)	<b>27</b>	<b>25</b>	<b>17</b>	<b>38</b>	<b>33</b>	<b>12</b>	<b>3.0</b>	<b>4.4</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>46</b>	<b>30</b>	<b>26</b>
L	Aug. 09	Influent	215 (32)	26 (2)	19 (5)	125 (23)	22 (7)	1142 (124)	3280 (657)	430 (27)	20 (10)	9.8 (4.2)	8.8 (2.5)	44 (13)	25 (6)	n/d
		Effluent	136 (6)	14 (3)	13 (2)	26 (5)	5.5 (0.7)	946 (86)	2787 (749)	397 (36)	9.8 (4.1)	7.2 (3.7)	6.3 (1.8)	6.2 (2.1)	12.6 (3.6)	n/d
		Eff. (%)	<b>37</b>	<b>46</b>	<b>27</b>	<b>79</b>	<b>73</b>	<b>17</b>	<b>16</b>	<b>7.7</b>	<b>50</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>84</b>	<b>49</b>	---
	March 09	Influent	215 (37)	34 (7)	19 (2)	46 (4)	4.7 (0.4)	788 (145)	1850 (251)	408 (17)	17 (13)	6.8 (3.9)	5.0 (3.4)	20 (5)	4.6 (0.5)	n/d
		Effluent	163 (33)	21 (6)	15 (2)	23 (1)	2.9 (0.3)	600 (58)	1659 (31)	404 (8)	13 (10)	5.7 (3.2)	3.7 (2.5)	6.5 (2.7)	2.8 (0.4)	n/d
		Eff. (%)	<b>25</b>	<b>37</b>	<b>21</b>	<b>50</b>	<b>39</b>	<b>24</b>	<b>10</b>	<b>1.1</b>	<b>27</b>	<b>17</b>	<b>27</b>	<b>69</b>	<b>40</b>	---
A	Jul. 09	Influent	216 (14)	23 (4)	19 (8)	105 (7)	26 (1)	1278 (110)	2849 (364)	1009 (74)	26 (2)	7.6 (0.7)	1.8 (0.5)	51 (1)	16 (6)	n/d
		Effluent	208 (17)	16 (4)	16 (7)	93 (10)	25 (2)	1181 (130)	2666 (460)	961 (98)	20 (2)	7.4 (0.8)	1.3 (0.3)	44 (6)	15 (5)	n/d
		Eff. (%)	<b>3.8</b>	<b>33</b>	<b>20</b>	<b>11</b>	<b>3.2</b>	<b>7.8</b>	<b>6.6</b>	<b>4.8</b>	<b>24</b>	<b>2.4</b>	<b>26</b>	<b>13</b>	<b>7.8</b>	---
W	Aug. 09	Influent	144 (81)	16 (8)	30 (21)	128 (46)	13 (2)	1463 (580)	1858 (474)	706 (124)	18 (3)	9.4 (3.4)	9.9 (6.5)	29 (8)	26 (2)	n/d
		Effluent	86 (48)	8.1 (3.9)	24 (18)	70 (17)	8.1 (0.9)	906 (426)	1311 (382)	681 (112)	11 (2)	7.1 (3.3)	6.0 (3.6)	13 (5)	17 (4)	n/d
		Eff. (%)	<b>41</b>	<b>48</b>	<b>27</b>	<b>43</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>30</b>	<b>3.6</b>	<b>42</b>	<b>28</b>	<b>35</b>	<b>56</b>	<b>36</b>	---
N (Primary )	Jul. 09	Influent	136 (9)	7.7 (0.8)	10 (3)	114 (7)	6.2 (0.5)	2982 (710)	4166 (591)	3124 (880)	9.0 (0.2)	6.3 (3.2)	4.3 (1.4)	50 (4)	6.4 (0.7)	n/d
		Effluent	131 (11)	5.8 (0.8)	7.8 (3.1)	112 (14)	5.8 (1.9)	2563 (564)	4042 (311)	2956 (427)	7.6 (0.8)	5.8 (2.9)	4.0 (1.3)	44 (2)	5.9 (0.7)	n/d
		Eff. (%)	<b>3.5</b>	<b>26</b>	<b>24</b>	<b>1.5</b>	<b>6.1</b>	<b>14</b>	<b>3.0</b>	<b>4.9</b>	<b>16</b>	<b>8.5</b>	<b>7.5</b>	<b>13</b>	<b>7.5</b>	---
Mean (secondary)		Influent	236	20	20	138	18	1343	2703	757	18	9.1	8.0	49	15	5.2
		Effluent	173	12	15	71	11	1087	2487	713	11	7.4	5.6	23	10	3.4
		Eff. (%)	<b>27</b>	<b>38</b>	<b>23</b>	<b>48</b>	<b>40</b>	<b>19</b>	<b>10</b>	<b>5.8</b>	<b>36</b>	<b>19</b>	<b>29</b>	<b>53</b>	<b>35</b>	<b>36</b>



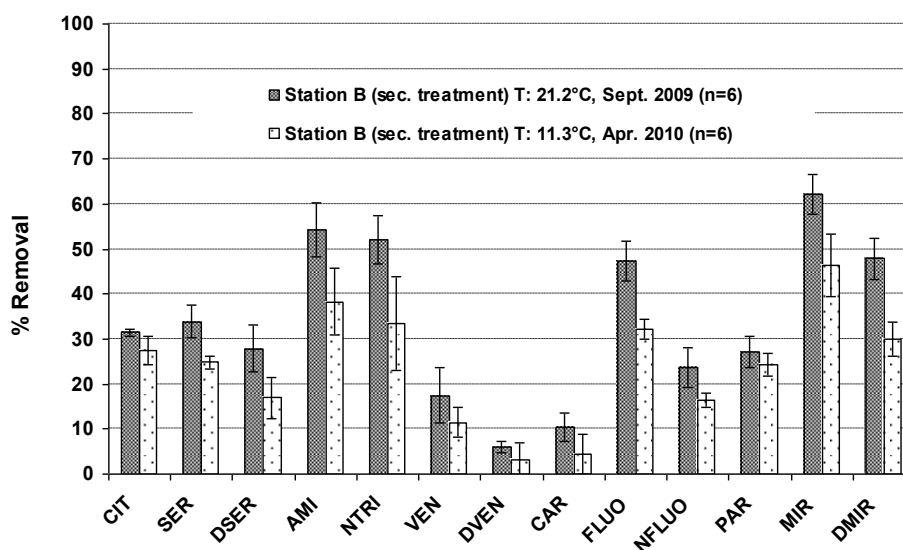


**Figure 4-1.** Representative FLUVO chromatogram of one raw sewage sample for two extracted multiple reactions monitoring (MRM) transitions.

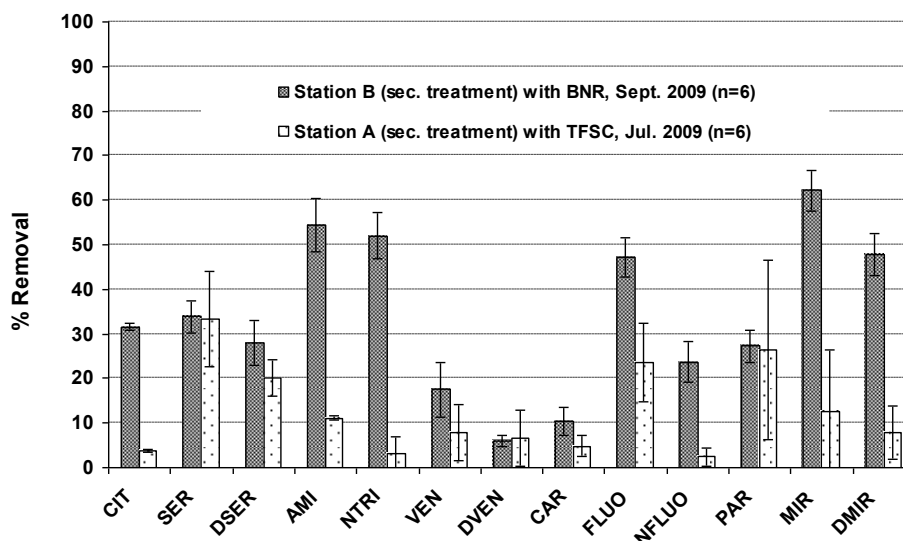


**Figure 4-2.** Comparison of mean removal rates obtained from STP B (secondary treatment, biological nutrient removal, summer) and STP N (primary treatment, chemically enhanced with alum and  $\text{FeCl}_3$ , summer).

Comparison of removals of parent compounds and metabolites (SER/DSER, VEN/DVEN, MIR/DMIR, FLU/NFLU, and FLUVO/DFLUVO) across all studied treatment types indicated that in all cases removal of the parent compound was better than removal of the metabolite (Mann-Whitney tests,  $\alpha=0.05$ ). Therefore, even if antidepressants are extensively metabolized, their metabolites may continue to be biologically active (Calisto et Esteves, 2009). As such, several studies have shown NFLU to possess significant pharmacological activity compared with the parent drug FLU (De Vane, 1999). Another example, the principal metabolite of SER, DSER, was found to be about one-eighth as potent as an inhibitor of serotonin reuptake *in vitro* (Koe et al., 1983).



**Figure 4-3.** Comparison of mean removal rates obtained from STP B (secondary treatment, biological process) in summer and winter.



**Figure 4-4.** Comparison of mean removal rates obtained between STP B (secondary treatment, biological nutrient removal) and STP A (secondary treatment, trickling filter/solids contact).

#### 4.3.3. Antidepressants in treated biosolids

All biosolids sampled for this study were the product of anaerobic digestion (**Tableau 4-1**). Anaerobic digestion typically has a retention time of 15 to 20 days (Tchobanoglous et al., 2004); therefore the treated biosolids were considered as already “composited” and grab samples were considered sufficiently representative of the solids treatment train. To date, the fate of antidepressants in treated biosolids remained largely unknown. The cumulated results reported therein highlighted the physicochemical trend of each studied antidepressant. Among the studied STPs, the highest mean concentrations in treated biosolids samples were found for CIT ( $1033 \text{ ng g}^{-1}$ ), amitriptyline – AMI ( $768 \text{ ng g}^{-1}$ ), and VEN ( $833 \text{ ng g}^{-1}$ ). The mean concentrations of the antidepressants FLU ( $92.1 \pm 47.6 \text{ ng g}^{-1}$ ) and paroxetine – PAR ( $60.2 \pm 30.9 \text{ ng g}^{-1}$ ) reported by Radjenović et al. (2009) in secondary sludge samples were consistent with our results (**Tableau 4-4**). Across all of the

studied STPs, lower levels of antidepressant were detected in treated biosolids samples for *N*-desmethyl metabolites in comparison to their respective parent molecule. These findings indicate that more polar compounds do not tend to partition to wastewater solids.

One objective of this study was to experimentally determine the specific sorption coefficient ( $K_d$ ) values for antidepressants and metabolites to treated biosolids. The  $K_d$  can be estimated by the ratio  $[\text{Biosolids}] / [\text{Effluent}]$ , where  $[\text{Biosolids}]$  is the concentration of antidepressants in treated biosolids ( $\text{ng kg}^{-1}$ ) and  $[\text{Effluent}]$  is the concentrations of antidepressants in final effluent ( $\text{ng L}^{-1}$ ) (Deegan et al., 2011). The obtained  $K_d$  values were applied in order to evaluate the affinity of compounds to solids in STPs. According to cumulated results, lower  $K_d$  values were obtained with VEN, DVEN, and CAR (**Tableau 4-4**). These values ranged from 67 to  $490 \text{ L kg}^{-1}$  and were estimated to be quite low in comparison to  $K_d$  values calculated for other compounds. As a general rule, sorption is defined less pronounced for substances with  $\log K_d$  values less than 2, but is important when the  $\log K_d$  value is greater than 4 (Deegan et al., 2011). The  $\log K_d$  values for VEN, DVEN, and CAR are close to 2. Therefore, the sorption of these three compounds on sludge can be assumed to be minimal. Among other antidepressants, higher mean  $\log K_d$  values for all studied STPs were calculated in order for sertraline – SER (4.6), Desmethylsertraline – DSER (4.2), paroxetine – PAR (4.2), FLU (4.1), and AMI (4.1).

Although there are few experimental  $K_d$  data on antidepressants, Hörsing et al. (2011) reported  $K_d$  values ( $\text{L kg}^{-1}$ ) in secondary sludge - long sludge age (SER:  $1.7 \times 10^4$ , VEN:  $1.0 \times 10^2$ , FLU:  $6.0 \times 10^3$ , PAR:  $8.3 \times 10^3$ , AMI:  $2.8 \times 10^3$ ) that were very similar to the calculated  $K_d$  in this study (SER:  $3.1 \times 10^4$ , VEN:  $3.5 \times 10^2$ , FLU:  $8.8 \times 10^3$ , PAR:  $1.5 \times 10^4$ , AMI:  $9.3 \times 10^3$ ). Slight variations between those two sets of data (higher  $K_d$  values in the present study) may be explained by the inherent variability of concentrations of antidepressants in composite final effluent samples that could not be directly correlated to grab samples of treated biosolids. As reported by Delle Site (2001), specific sorption

coefficients generally decrease with increasing temperature. Accordingly, the  $K_d$  values for STP B calculated for samples collected at 21.2°C were lower than  $K_d$  values for samples collected at 11.3°C. Chiou et al. (1979) observed that an inverse relationship exists for organic compounds between sorption coefficients and solubility. Lower  $K_d$  values are found at higher temperatures for most organic compounds for which solubility increases with temperature (Delle Site, 2001). Therefore, the measured effect of temperature on sorption is the combination of the temperature-dependence of both sorption coefficient and solubility.

Another aspect that could not be verified in this study was the possible influence of pH on  $K_d$  values. Hörsing et al. (2011) reported a significant variation of -9% and -7%, respectively, for FLU and SER in the aqueous phase after an increase in pH from 6 to 8. Since all antidepressants present basic properties with their amine moieties ( $pK_a$  8 to 9), having a higher pH value close to 8 would result in a higher ratio of dissociated and hence more hydrophobic molecules in the sludge, and subsequently higher  $K_d$  values. However, for the neutral drug CAR no significant variations of  $K_d$  values were observed by Hörsing et al. (2011) following the pH transition.

**Tableau 4-4.** Mean (n=4) concentrations of the antidepressants and metabolites in treated biosolids detected in different Canadian STPs along with corresponding experimental calculated sorption coefficient -  $K_d$ .

STPs		Compound concentrations in ng g <sup>-1</sup> (standard deviation) dry weight, n=4									Specific sorption coefficient K <sub>d</sub> in L kg <sup>-1</sup>						
		CIT	SER	DSER	AMI	NTRI	VEN	DVEN	CAR	FLU	NFLU	PAR	MIR	DMIR	FLUVO	DFLUVO	
B	Sept. 09	Sludge K <sub>d</sub>	296 (41) 1.3x10 <sup>3</sup>	252 (26) 3.1x10 <sup>4</sup>	103 (14) 7.6x10 <sup>3</sup>	336 (93) 2.6x10 <sup>3</sup>	28 (7) 2.2x10 <sup>3</sup>	318 (79) 2.2x10 <sup>2</sup>	210 (12) 6.7x10 <sup>1</sup>	194 (30) 2.1x10 <sup>2</sup>	74 (20) 8.6x10 <sup>3</sup>	36 (8) 4.8x10 <sup>3</sup>	13 (1) 1.1x10 <sup>3</sup>	49 (9) 1.8x10 <sup>3</sup>	5.6 (1.4) 1.5x10 <sup>3</sup>	17 (2) 6.0x10 <sup>3</sup>	8.1 (0.2) 8.6x10 <sup>2</sup>
	Apr. 10	Sludge K <sub>d</sub>	357 (53) 1.6x10 <sup>3</sup>	240 (43) 4.2x10 <sup>4</sup>	137 (27) 1.1x10 <sup>4</sup>	324 (26) 3.7x10 <sup>3</sup>	26 (5) 2.4x10 <sup>3</sup>	289 (18) 2.0x10 <sup>2</sup>	219 (17) 7.3x10 <sup>1</sup>	237 (43) 2.6x10 <sup>2</sup>	92 (4) 1.4x10 <sup>4</sup>	27 (5) 2.8x10 <sup>3</sup>	22 (8) 4.4x10 <sup>3</sup>	51 (5) 1.2x10 <sup>3</sup>	3.3 (0.6) 3.1x10 <sup>2</sup>	29 (8) 7.4x10 <sup>3</sup>	10 (2) 1.2x10 <sup>3</sup>
L	Aug. 09	Sludge K <sub>d</sub>	1381 (223) 1.0x10 <sup>4</sup>	528 (95) 3.7x10 <sup>4</sup>	279 (47) 2.1x10 <sup>4</sup>	583 (135) 2.3x10 <sup>4</sup>	49 (9) 8.9x10 <sup>3</sup>	366 (78) 3.9x10 <sup>2</sup>	252 (40) 9.0x10 <sup>1</sup>	119 (28) 3.0x10 <sup>2</sup>	116 (51) 1.2x10 <sup>4</sup>	60 (8) 8.3x10 <sup>3</sup>	70 (10) 1.1x10 <sup>4</sup>	68 (5) 1.1x10 <sup>4</sup>	9.3 (2.0) 7.3x10 <sup>2</sup>	n/d ---	n/d ---
	March 09	Sludge K <sub>d</sub>	725 (283) 4.4x10 <sup>3</sup>	493 (66) 2.3x10 <sup>4</sup>	253 (3) 1.7x10 <sup>4</sup>	372 (47) 1.6x10 <sup>4</sup>	54 (14) 1.9x10 <sup>4</sup>	294 (83) 4.9x10 <sup>2</sup>	140 (55) 8.4x10 <sup>1</sup>	133 (19) 3.3x10 <sup>2</sup>	95 (35) 7.5x10 <sup>3</sup>	35 (18) 6.2x10 <sup>3</sup>	68 (6) 1.9x10 <sup>4</sup>	55 (10) 8.4x10 <sup>3</sup>	33 (8) 1.2x10 <sup>4</sup>	n/d ---	n/d ---
A	Jul. 09	Sludge K <sub>d</sub>	1087 (79) 5.2x10 <sup>3</sup>	388 (47) 2.4x10 <sup>4</sup>	171 (8) 1.1x10 <sup>4</sup>	632 (52) 6.8x10 <sup>3</sup>	61 (15) 2.4x10 <sup>3</sup>	499 (48) 4.2x10 <sup>2</sup>	488 (34) 1.8x10 <sup>2</sup>	245 (55) 2.5x10 <sup>2</sup>	152 (38) 7.7x10 <sup>3</sup>	52 (14) 7.0x10 <sup>3</sup>	65 (7) 5.1x10 <sup>4</sup>	84 (8) 1.9x10 <sup>3</sup>	13 (2) 9.1x10 <sup>2</sup>	n/d ---	n/d ---
W	Aug. 09	Sludge K <sub>d</sub>	95 (7) 1.1x10 <sup>3</sup>	203 (14) 2.5x10 <sup>4</sup>	97 (7) 4.1x10 <sup>3</sup>	263 (68) 3.8x10 <sup>3</sup>	22 (1) 2.6x10 <sup>3</sup>	328 (57) 3.6x10 <sup>2</sup>	88 (20) 6.7x10 <sup>1</sup>	59 (9) 8.6x10 <sup>1</sup>	34 (2) 3.2x10 <sup>3</sup>	8.9 (1.7) 1.3x10 <sup>3</sup>	11 (3) 1.9x10 <sup>3</sup>	27 (3) 2.1x10 <sup>3</sup>	14 (1) 8.3x10 <sup>2</sup>	n/d ---	n/d ---
N (primary)	Jul. 09	Sludge K <sub>d</sub>	3294 (481) 2.5x10 <sup>4</sup>	482 (63) 8.4x10 <sup>4</sup>	246 (30) 3.1x10 <sup>4</sup>	2868 (342) 2.6x10 <sup>4</sup>	168 (53) 2.9x10 <sup>4</sup>	3735 (431) 1.5x10 <sup>3</sup>	555 (14) 1.4x10 <sup>2</sup>	735 (163) 2.2x10 <sup>2</sup>	339 (44) 4.4x10 <sup>4</sup>	93 (39) 1.6x10 <sup>4</sup>	91 (30) 2.3x10 <sup>4</sup>	143 (11) 3.3x10 <sup>3</sup>	32 (2) 5.4x10 <sup>3</sup>	n/d ---	n/d ---
Mean (secondary)		Sludge K <sub>d</sub> log K <sub>d</sub>	657 4.0x10 <sup>3</sup> 3.6	351 3.1x10 <sup>4</sup> 4.5	174 1.2x10 <sup>4</sup> 4.1	418 9.3x10 <sup>3</sup> 4.0	40 6.2x10 <sup>3</sup> 3.8	349 3.5x10 <sup>2</sup> 2.5	233 9.4x10 <sup>1</sup> 2.0	164 2.4x10 <sup>2</sup> 2.4	94 8.8x10 <sup>3</sup> 3.9	36 5.0x10 <sup>3</sup> 3.7	41 1.5x10 <sup>4</sup> 4.2	56 4.4x10 <sup>3</sup> 3.6	13 2.7x10 <sup>3</sup> 3.4	23 6.7x10 <sup>3</sup> 3.8	9.2 1.0x10 <sup>3</sup> 3.0

Note:  $K_d$  values were estimated assuming that 1 g = 1 mL.

#### 4.4. Conclusion

In this study, the fate of antidepressants and their *N*-desmethyl metabolites was studied in 5 different STPs across Canada. Using two validated LC-MS/MS analytical methods, the concentrations of 15 compounds were determined in raw influent, final effluent and treated biosolids samples. The results showed preliminary evidence that primary treatment and TFSC have limited capacity to remove antidepressants from sewage, while activated sludge, BAF, and BNR treatment yielded moderate removal efficiencies. Analyses of treated biosolids samples enabled the calculation of experimental  $K_d$  values for each antidepressant detected at the different STPs. The calculated  $\log K_d$  values revealed that SER, DSER, PAR and FLU were the most retained antidepressant on biosolids ( $\log K_d > 4$ ). In contrast, VEN, DVEN and CAR were found to be more difficult to remove from sewage by partitioning to solids ( $\log K_d \leq 2$ ). Limitations of primary and secondary treatment processes to eliminate such pharmaceuticals residues in wastewater may require consideration of advanced treatment strategies. Further experiments are needed to investigate the fate of pharmaceuticals following more advanced treatments. Of particular concern is the potential that removal of antidepressants following disinfection with advanced oxidation such as ozone could generate other by-products that would need to be identified, quantified and evaluated for their biological activity.

#### 4.5. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Laura Kinsman and Mingu D. Kim from the University of Western Ontario for the information provided for each studied STP. The authors also thank the STPs that participated in this study. This work was funded by the Chemical Management Plan – Health Canada and the St. Lawrence Action Plan.

## **Supplementary material**

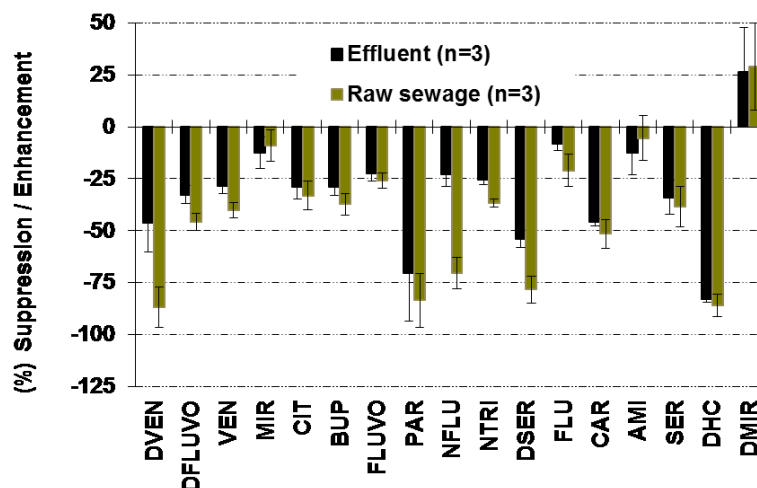


**Tableau 4-5.** Optimized LC-(ESI+) QqQ conditions for the analysis of antidepressants.

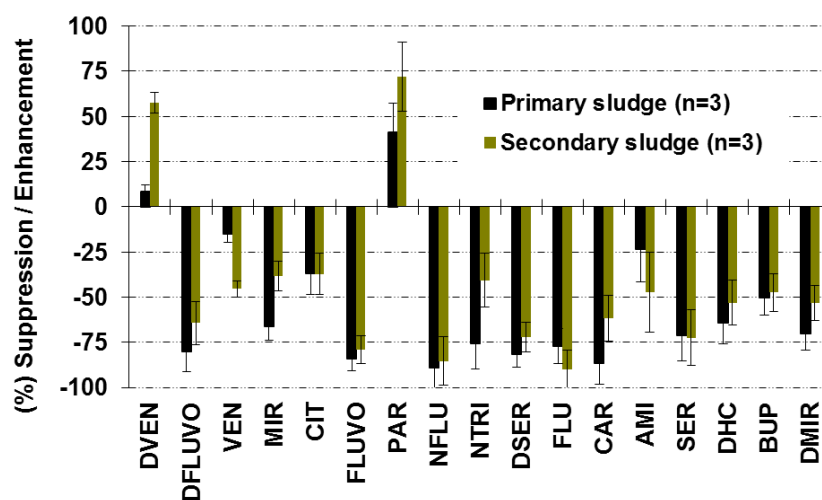
Compounds	$t_R$ (min)	SRM transitions (m/z)	Fragmentor (V)	Collision Energy (V)
Carbamazepine (CAR)	5.80	237.1 → 194.0, 165.0	110	17, 50
10,11-Dihydrocarbamazepine (DHC) <sup>1</sup>	5.87	239.3 → 194.0	120	21
Desmethylvenlafaxine (DVEN)	6.16	264.2 → 246.1, 107.1	105	9, 41
Desmethyilmirtazepine (DMIR)	7.07	252.3 → 195.1, 209.1	110	21, 21
Cis-Tramadol <sup>13</sup> -d <sub>3</sub> (TRA) <sup>2</sup>	7.21	268.1 → 250.2	80	8
Mirtazepine (MIR)	7.27	266.4 → 195.0, 209.0	115	21
Bupropion-d <sub>9</sub> (BUP) <sup>1</sup>	7.60	249.2 → 185.0	95	9
Desmethylfluvoxamine (DFLUVO)	7.73	305.3 → 229.0, 173.0	90	5, 50
Venlafaxine (VEN)	8.43	278.2 → 260.1, 121.1	95	9, 29
Fluvoxamine (FLUVO)	8.95	319.3 → 200.0, 226.0	95	21, 9
Citalopram (CIT)	8.99	325.2 → 109.1, 262.1	115	25, 17
Desmethylsertraline (DSER)	9.34	275.1 → 158.9, 123.0	95	21, 50
Paroxetine (PAR)	9.69	330.2 → 192.0, 135.0	125	21, 45
Norfluoxetine (NFLU)	9.96	296.1 → 134.2	75	5
Sertraline (SER)	10.62	306.1 → 158.9, 123.0	80	29, 50
Fluoxetine (FLU)	11.26	310.1 → 148.1	90	5
Amitriptyline (AMI)	11.45	278.2 → 105.1, 117.1	115	21, 21
Nortriptyline (NTRI)	12.42	264.2 → 105.1, 233.1	100	21, 13

<sup>1</sup> Surrogate standards, <sup>2</sup> Internal standard

A



B



**Figure 4-5.** Matrix effects representation of spiked extracts: A) sewage wastewater (effluent and raw sewage), B) primary and secondary sewage sludge.

## **Chapitre 5 : Oxydation d'antidépresseurs par ozone – Évaluation du traitement et caractérisation de nouveaux sous-produits par spectrométrie de masse à haute résolution (LC-QqToFMS)**

---

Ozone oxidation of antidepressants in wastewater – Treatment evaluation and  
characterization of new by-products by LC-QqToFMS

Lajeunesse A., Blais M., Barbeau B., Sauvé S., Gagnon C. 2012.

*Chemistry Central Journal* (article soumis le 17 septembre 2012)

### **Note sur ma contribution**

Ma participation aux travaux de recherche : J'ai réalisé les manipulations, les analyses et l'interprétation des résultats.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires de Dr. Gagnon et du Prof. Sébastien Sauvé, mes directeurs de thèse.

Collaboration des co-auteurs : Mireille Blais de l'École Polytechnique a participé à l'échantillonnage et à l'ajustement du générateur d'ozone. Le Prof. Benoît Barbeau également de l'École Polytechnique a participé à la révision du manuscrit.

## Abstract

The fate of 14 antidepressants along with their respective *N*-desmethyl metabolites and the anticonvulsive drug carbamazepine (CAR) was examined in a primary sewage treatment plant (STP) and following advanced treatments with ozone ( $O_3$ ). The concentrations of each compound were determined in raw sewage, effluent and sewage sludge samples by LC-MS/MS analysis. Current primary treatments using physical and chemical processes removed little of the compounds (mean removal efficiency: 19%). Experimental sorption coefficients ( $K_d$ ) of each studied compounds were also calculated. Sorption of venlafaxine, desmethylvenlafaxine, and carbamazepine on sludge was assumed to be negligible ( $\log K_d \leq 2$ ), but higher sorption behaviour can be expected for sertraline ( $\log K_d \geq 4$ ). Ozonation treatment with  $O_3$  ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) led to a satisfactory mean removal rate of 88% of the compounds. Screening of the final ozone-treated effluent samples by high resolution-mass spectrometry (LC-QqToFMS) did confirm the presence of related by-products. The present study becomes the first to report the formation and detection of antidepressant by-products in ozone treated effluents. The work emphasizes that the removal of pharmaceutical products with advanced oxidation such as ozone could potentially generate by-products of unknown toxicity.

## 5.1. Introduction

Urban wastewaters are one of the major sources of pharmaceutically-active compounds (PhACs) into aquatic environments (Halling-Sørensen, 1998; Daughton et Ternes, 1999). The elimination of many pharmaceuticals in sewage treatment plants (STPs) being often incomplete (Ternes, 1998; Heberer, 2002; Coetsier et al., 2009), effluents from STPs thus contribute to a significant load of pharmaceutical residues in the receiving waters of rivers and lakes (Langford et Thomas, 2009). Little is however known on the potential release of transformation by-products following advanced wastewater treatments.

Among the most prescribed PhACs throughout the world are the psychiatric drugs that include the antidepressants and the antiepileptic drug carbamazepine (CAR) frequently used for treating schizophrenia and bipolar disorder (Van Rooyen et al., 2002; Calisto et Esteves, 2009). Eco-toxicity studies of these neuroactive compounds provided evidence for biological effects on aquatic organisms (Fong, 2001; Gagné et al., 2006; Mennigen et al., 2010b; Lajeunesse et al., 2011; Lazzara et al., 2012). Although the occurrence of antidepressants in sewage effluents (Himmelsbach et al., 2006; Lajeunesse et al., 2008; Schultz and Furlong, 2008; Langford and Thomas, 2009; Metcalfe et al., 2010) and wastewater sludge (Radjenović et al., 2009; Hörsing et al., 2011; Lajeunesse et al., 2012) has been demonstrated, the fate of these substances following different treatments in STPs has not been extensively documented. A previous study indicated that a primary treatment process had limited capability to remove and/or degrade antidepressants residues in wastewater (Lajeunesse et al., 2008). Further results obtained with STPs operating different biological processes (e.g. secondary treatment with activated sludge) revealed moderate potential (mean removal rates  $\leq 30\%$ ) to degrade antidepressants from wastewater (Lajeunesse et al., 2012). Therefore, alternative treatment technologies may have to be implemented or combined to achieve high removal of compounds in STPs (Oller et al., 2011). As such, experimental evidence reported elsewhere clearly demonstrates that existing limitations in primary and secondary processes can be overcome with advanced

treatment strategies including chemical oxidation with ozone or the use of high pressure membrane technologies (Benotti et al., 2009; Wert et al., 2009; Méndez-Arriaga et al., 2011).

While conventional activated sludge treatments were shown to degrade pharmaceuticals to varying extent (Huber et al., 2005), ozone ( $O_3$ ) treatments showed promising results in terms of removal efficiencies as an effective oxidizer to remove endocrine disruptors compounds and pharmaceuticals products in wastewater (Snyder et al., 2006; Gagnon et al., 2008). Generally,  $O_3$  reacts with organic contaminants through either the direct reaction with molecular  $O_3$  (1-3 dipolar cyclo addition reaction on unsaturated bonds, electrophilic reaction on aromatics having electron donor groups e.g. OH,  $NH_2$ ) or by decomposition through the formation of chain intermediate free radicals, including the hydroxyl radical  $OH^\bullet$  (less selective reaction on saturated aliphatic molecules) (Snyder et al., 2006; Langlais, Reckhow et Brink, 1991). The stability of dissolved ozone is readily affected by pH, ultraviolet (UV) light, ozone concentration, and the concentration of radical scavengers such carbonate – bicarbonate species, the dissolved organic carbon and humic acids (Tomiya, Fukutomi et Gordon, 1985; Langlais, Reckhow et Brink, 1991). Except for few experiments completed with fluoxetine (FLU), the number of studies dedicated to the elimination of antidepressants by oxidation processes (e.g.  $TiO_2$  membrane reactor,  $O_3$  with UV activation,  $O_3$  with  $H_2O_2$ ) has been rather limited (Benotti et al., 2009; Wert et al., 2009; Méndez-Arriaga et al., 2011). Since molecular  $O_3$  is a selective electrophile that reacts quickly with amine and double bonds moieties (Snyder et al., 2006), ozonation should be efficient to degrade antidepressants mostly constituted of secondary or tertiary amine and conjugated rings. However, as reported for  $\beta$ -Lactam antibacterial agents (e.g. penicillin G, cephalexin) spiked in wastewater,  $O_3$  reaction leads to the formation of biologically active sulfoxides analogues (Dodd et al., 2010). For antidepressants, no study on the transformation products following an  $O_3$  treatment in wastewater is currently available. Furthermore, no data has yet been reported neither on by-products toxicity. Nevertheless, the formation of *N*-oxide, amide, aldehyde, and carboxylic acid by-products

is expected after ozonation of secondary and tertiary amine compounds in aqueous solutions (Elmghari-Tabib et al., 1982a; Elmghari-Tabib et al., 1982b).

In the present work, the effectiveness of ozone treatments was tested at three different concentrations for the oxidation of 14 antidepressants along with their direct *N*-desmethyl metabolites and the anticonvulsive drug carbamazepine during ozonation of a primary-treated effluent. The goal of the study was also to investigate the occurrence of antidepressant by-products formed in treated effluent after ozonation.

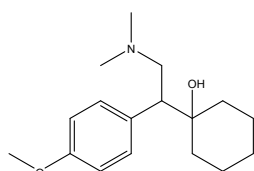
## 5.2. Material and methods

### 5.2.1. Chemicals and materials

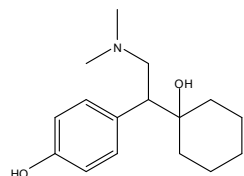
All studied compounds were chosen based on their availability as certified standards (purity grade > 98%). Fluoxetine (FLU), norfluoxetine (NFLU), paroxetine (PAR), sertraline (SER), (*S*)-citalopram (CIT), fluvoxamine (FLUVO), desmethylfluvoxamine (DFLUVO), mirtazapine (MIR), and desmethylmirtazepine (DMIR) were provided by Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Ontario, Canada). Desmethylsertraline (DSER), venlafaxine (VEN), *O*-desmethylvenlafaxine (DVEN), and bupropion-*d*<sub>9</sub> (BUP) were obtained from Nanjing Jinglong PharmaTech (Nanjing, China). Amitriptyline (AMI), nortriptyline (NTRI), carbamazepine (CAR), and 10,11-dihydrocarbamazepine (DHC) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA), while cis-tramadol-<sup>13</sup>C-*d*<sub>3</sub> (TRA) was purchased from Cerilliant Corp. (Round Rock, Texas, USA). The high-performance liquid chromatography-grade solvents (methanol and acetonitrile) and ammonium hydroxide were provided by Caledon Laboratories Ltd. (Georgetown, Ontario, Canada). Reagent-grade hydrochloric acid, acetic acid, ammonium bicarbonate, and ACS grade ethyl acetate were provided by American Chemicals Ltd. (Montreal, Quebec, Canada). Solid-phase extraction (SPE) cartridges of 6 mL, 200 mg Strata<sup>TM</sup>X-C were purchased from Phenomenex (Torrance, California, USA). Stock solutions of 100 mg L<sup>-1</sup> of

each substance were prepared in methanol and stored at 4°C in amber glass bottles. The chemical structures of the selected compounds are provided in **Figure 5-1**.

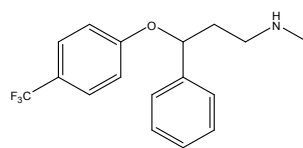




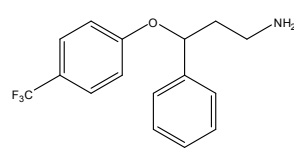
Venlafaxine (VEN)



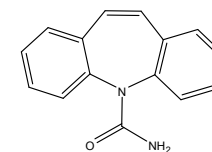
Desmethylvenlafaxine (DVEN)



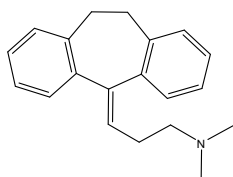
Fluoxetine (FLU)



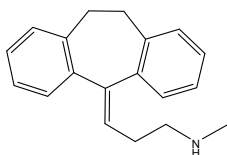
Norfluoxetine (NFLU)



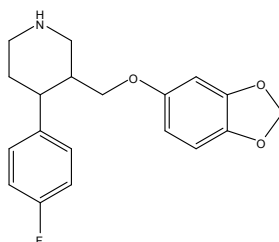
Carbamazepine (CAR)



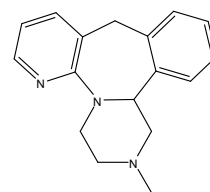
Amitriptyline (AMI)



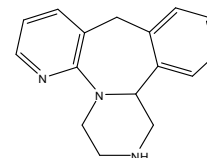
Nortriptyline (NTRI)



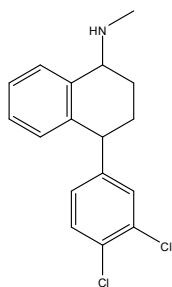
Paroxetine (PAR)



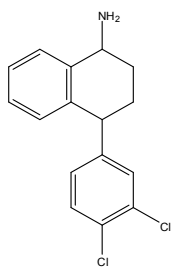
Mirtazepine (MIR)



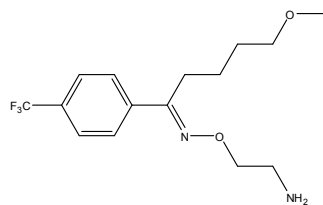
Desmethyilmirtazepine (DMIR)



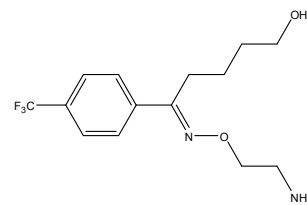
Sertraline (SER)



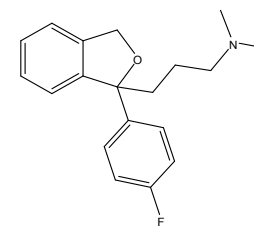
Desmethylsertraline (DSER)



Fluvoxamine (FLUVO)



Desmethylfluvoxamine (DFLUVO)



Citalopram (CIT)

**Figure 5-1.** Chemical structures of the studied compounds.

## 5.2.2. Instrumentation

### 5.2.2.a. Liquid chromatography (LC)

Liquid chromatography (LC) was performed using an Agilent 1200 Series LC system equipped with binary pumps, degasser, and a thermostated autosampler maintained at 4°C. The antidepressants were separated on a Kinetex<sup>®</sup> XB-C18 column (100 mm x 2.10 mm, 1.7 µm) using a binary gradient made of (A) ammonium bicarbonate (5 mM) pH 7.8, and (B) acetonitrile at a flow rate of 400 µL min<sup>-1</sup>. The volume of injection was 15 µL for affluent, effluent, and sludge extracts. The gradient used was (%B): 0 min (10%), 6 min (80%), 10 min (80%), 12 min (90%), 14 min (10%), and 16 min (10%). An equilibration time of 4 min was used resulting in a total run time of 20 min. The column temperature was maintained at 40°C.

### 5.2.2.b. Tandem-mass spectrometry (QqQMS, QqToFMS)

For quantitative analysis, the LC system was coupled to a 6410 triple quadrupole mass spectrometer (QqQMS) manufactured by Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The capillary was maintained at 4000 V, and the cone voltage was optimized for each compound in the positive-ion mode (ESI+). Additional detector parameters were held constant for all antidepressants: gas temperature 325°C; gas flow 10 L min<sup>-1</sup>; nebulizer 35 psi and dwell time 50 ms. For qualitative analysis, a 6530 quadrupole time-of-flight mass spectrometer (QqToFMS) also manufactured by Agilent Technologies, was utilized. The QqToFMS was equipped with a thermal gradient focussing ESI source (Jet Stream technology). Source parameters consisted of the following: gas temperature 325°C; sheath gas temperature 350°C; sheath gas flow 11 L min<sup>-1</sup>; drying gas flow 5 L min<sup>-1</sup>; nebulizer 35 psig, fragmentor 100 V and capillary voltage 4000 V. The QqToFMS was operated in the 4 GHz High Resolution mode with a low mass range (1700 *m/z*). Purine (121.050873 *m/z*) and Hexakis (922.009798 *m/z*)

were used as internal reference masses to improve mass accuracy. Initial tests were performed on treated effluent extracts in high resolution tandem MS mode using a mass range of  $m/z$  100-400 (specific collision energy: 0 V) at a rate of 5 spectra  $s^{-1}$  to screen the exact  $[M+H]^+$  masses of the precursor ions. Identified compounds were then fragmented with different specific collision energies varying between 0 and 10 V. For both detection systems, the MassHunter software from Agilent Technologies was used for data acquisition and processing. Optimized parameters for QqQMS are listed as **supplementary material (Tableau 5-4)**.

### 5.2.3. Sample location and collection

#### 5.2.3.a. Sample location

All samples were collected onsite at the sewage treatment plant (STP) of the city of Repentigny (30 km North-East of Montreal, Qc, Canada) during an ozonation pilot-study performed in June 2011. The Repentigny STP typically treats 25 000  $m^3$  of raw sewage daily for a population of approximately 60 000 persons. Wastewater is primary-treated using both physical and chemical treatments (e.g. flocculation of suspended matters with alum and/or  $FeCl_3$ ). For the purpose of this study, treated wastewater was further experimentally ozone-oxidized on site. Main characteristics of the Repentigny STP are reported in this section (**Tableau 5-1**). Ozonation of the effluent consisted of an ozone ( $O_3$ ) generator (Ozone Solution, Model: TG10-Ozone Solution) fed with ultra-pure oxygen (99.9999%). Gaseous ozone was bubbled in a ceramic diffuser located inside a vertical column (6.3 m, 5.08 internal diameter) where both gas transfer and contact time occurred simultaneously. The water flow was maintained at 1.2  $L\ min^{-1}$ , while the  $O_3$  flow rate injection was kept around 75 to 110  $N\ mL\ min^{-1}$  (head pressure: 10 psi). Contact time of  $O_3$  with treated effluent was 10 min. Ozone transfer was monitored by measuring off-gas ozone concentrations using the standard KI procedure (Standard method 2350, 2005).

Applied ozone dosages were then corrected for ozone transfer efficiency which varied from 75 to 80%. Total and residual dissolved O<sub>3</sub> concentrations were determined following the standard indigo trisulfonate colorimetric method (U.S. EPA Standard method 4500-03 B, 2005).

**Tableau 5-1.** Main water characteristics of the Repentigny sewage treatment plant.

Wastewater	Temperature (°C)	pH	Alkalinity (mg L <sup>-1</sup> ) CaCO <sub>3</sub>	TSS (mg L <sup>-1</sup> )	BOD <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	COD (mg L <sup>-1</sup> )
Raw sewage (Influent)	17	7.25	189	146	136	227
Effluent	---	7.15	165	12	36	59

TSS: Total Suspended Solids, BOD<sub>5</sub>: Biochemical Oxygen Demand, COD: Chemical Oxygen Demand.

#### 5.2.3.b. Sample collection

Typically, water samples of influent (raw sewage), primary-treated effluent, and ozone treated effluent were collected between 10h and 14h in polyethylene containers and stored on ice. Samples of wet primary sewage sludge (biosolids) were also collected on the same days and immediately stored on ice in polyethylene bottles. In the laboratory, approximately 10 g of wet biosolid material was filtered with a 0.7 µm glass fiber filter to get a dewatered sludge sample that was frozen, freeze-dried, and stored at -80°C until use. All samples were extracted and analyzed within 48-h after their collection.

#### 5.2.4. Sample extraction

##### 5.2.4.a. Sewage samples

The extraction method for raw sewage and effluent samples to be analysed for various classes of antidepressants was performed as previously described (Lajeunesse et al., 2008). The decision to incorporate the neutral drug carbamazepine (CAR) amongst the basic antidepressants forced us to modify the protocol (Lajeunesse et al., 2012) by replacing the strong cation exchange cartridge by a mixed-mode cartridge for sample purification (Strata X-C, Phenomenex). This persistent drug largely sold in Canada is currently prescribed in combination to antidepressant all over the world during therapy. Therefore, a monitoring of CAR is also required to better assess its environmental fate in different matrices.

The extraction protocol used here was similar to that described in Lajeunesse et al. (2012). Each 250 mL of filtered sewage sample was spiked with 100  $\mu$ L of a surrogate standard solution prepared in methanol (bupropion- $d_9$  / 10,11-dihydrocarbamazepine, 2.5 mg L<sup>-1</sup>) and 2.5 mL of methanol before lowering the pH to around 3 with 100  $\mu$ L of phosphoric acid (85%). The mixed-mode solid phase extraction (SPE) cartridges were conditioned with 4 mL of methanol followed by at least 8 mL of Milli-Q water. SPE was performed with a VAC ELUT SPS24 manifold (Varian) at flow rates  $\sim$ 10-15 mL min<sup>-1</sup>. After extraction, all cartridges were washed with 2 mL of HCl (0.1 M). The CAR molecules were eluted first with 2 x 2 mL of ethyl acetate prior to the evaporation of the tubes to dryness under a gentle stream of nitrogen. Meanwhile, all SPE cartridges were washed with 2 mL of methanol. The antidepressants retained onto the sorbent were then eluted with 2 x 2 mL of a solution of 5% (v/v) NH<sub>4</sub>OH in methanol. The combined fractions (e.g. CAR and antidepressants) were mixed with 100  $\mu$ L of a solution of cis-tramadol<sup>13</sup>- $d_3$  in methanol (5 mg L<sup>-1</sup>) as the internal standard and the tubes were evaporated

to dryness with nitrogen. The dried extracts were reconstituted with 0.50 mL of the mobile phase solution of ammonium bicarbonate (5 mM) pH 7.8 – acetonitrile (1:1 v/v) and injected in LC-QqQMS or LC-QqToFMS for analysis.

#### *5.2.4.b. Sewage sludge samples*

The simultaneous extraction of CAR and antidepressants in biosolid samples was completed using the protocol reported in Lajeunesse et al. (2012). Briefly, 0.200 g of freeze-dried sludge was transferred to a 16 x 150 mm borosilicate glass screw-top conical tube before adding 8 mL of a solution composed of methanol / 0.1 M acetic acid buffer solution pH 4.0 (1:1 v/v). Each tube were spiked with 100  $\mu$ L of a surrogate standard solution prepared in methanol (bupropion-*d*<sub>9</sub> / 10,11-dihydrocarbamazepine, 2.5 mg L<sup>-1</sup>). Samples were then shaken vigorously and mixed on a rotary extractor (Caframo REAX) for 15 min. After extraction, tubes were placed in a sonication bath for 15 min before adding 4 mL of Milli-Q water to each tube. Tubes were then centrifuged (320 x g) at room temperature for 5 min. Following the SPE protocol described previously for aqueous sewage samples, supernatants were transferred directly to mixed-mode cartridges. The final extracts were reconstituted in 0.5 mL of the mobile phase solution of ammonium bicarbonate (5 mM) pH 7.8 – acetonitrile (1:1 v/v), filtered with a PTFE 0.45  $\mu$ m filter, and then injected in LC-QqQMS system for analysis.

### **5.3. Results and discussion**

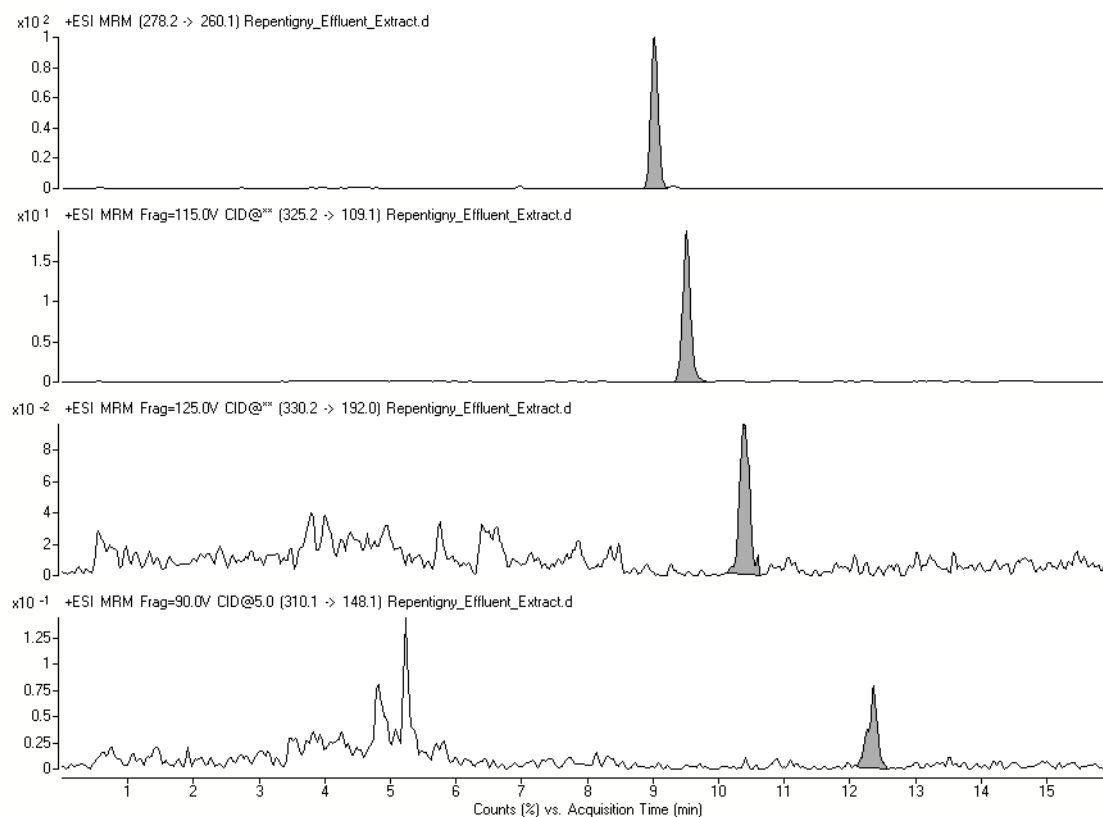
#### **5.3.1. Antidepressants in raw sewage and primary-treated effluent**

Out of the 15 compounds investigated, 13 were detected in raw sewage samples and only the antidepressant fluvoxamine (FLUVO) and its direct metabolite

desmethylfluvoxamine (DFLUVO) were not detected. Compound concentrations ranged from 6.5 ng L<sup>-1</sup> (norfluoxetine – NFLU) to 4185 ng L<sup>-1</sup> (*O*-desmethylvenlafaxine – DVEN) (**Tableau 5-2**). A typical chromatogram of the detected antidepressants venlafaxine – VEN, citalopram – CIT, paroxetine – PAR, and fluoxetine – FLU in a primary-treated effluent extract is depicted in **Figure 5-2**. Overall, moderate to poor removal rates were obtained for most antidepressants (mean removal efficiency of 19%). Results showed that current enhanced primary treatment using physical and chemical processes removed little of the studied compounds (Table 2). The substances with lowest removal rates were CAR (4.4%), along with the antidepressant metabolites nortriptyline – NTRI (6.8%) and NFLU (7.1%). Similar low removal rates were previously reported for antidepressants (Lajeunesse et al., 2008) and CAR (Lajeunesse and Gagnon, 2007) in primary-treated effluents. Despite a noteworthy reduction of total suspended solids – TSS (Table 1), the weak removal obtained for this primary treatment strongly suggests that a mechanism other than chemical adsorption would be required to effectively remove antidepressants in urban wastewater.

**Tableau 5-2.** Mean concentrations of studied compounds extracted in the wastewater (raw sewage, effluent) and biosolid samples from the Repentigny STP.

Compounds	Wastewaters (n=2)			Biosolids (n=2)		
	Raw sewage (ng L <sup>-1</sup> )	Effluent (ng L <sup>-1</sup> )	Removal Eff. (%)	Sludge (ng g <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> (L kg <sup>-1</sup> )	log K <sub>d</sub>
CIT	207 ± 12	148 ± 16	29	172 ± 38	1.2 x10 <sup>3</sup>	3.1
SER	13 ± 1	9.4 ± 0.1	28	43 ± 5	4.6 x10 <sup>3</sup>	3.7
DSER	23 ± 1	19 ± 3	17	31 ± 6	1.6 x10 <sup>3</sup>	3.2
AMI	223 ± 21	195 ± 11	13	58 ± 22	2.9 x10 <sup>2</sup>	2.5
NTRI	21 ± 3	19 ± 4	6.8	9.0 ± 1.1	4.7 x10 <sup>2</sup>	2.7
VEN	4061 ± 153	3144 ± 107	23	227 ± 49	7.2 x10 <sup>1</sup>	1.9
DVEN	4185 ± 133	3448 ± 279	18	73 ± 2	2.1 x10 <sup>1</sup>	1.3
CAR	747 ± 14	714 ± 13	4.4	26 ± 12	3.6 x10 <sup>1</sup>	1.6
FLU	11 ± 1	9.5 ± 0.6	16	15 ± 1	1.6 x10 <sup>3</sup>	3.2
NFLU	7.0 ± 0.4	6.5 ± 0.2	7.1	3.8 ± 0.6	5.8 x10 <sup>2</sup>	2.8
PAR	15 ± 1	13 ± 4	9.0	5.6 ± 3.6	4.2 x10 <sup>2</sup>	2.6
MIR	171 ± 20	109 ± 3	36	27 ± 6	2.5 x10 <sup>2</sup>	2.4
DMIR	41 ± 1	25 ± 1	38	13 ± 1	5.4 x10 <sup>2</sup>	2.7



**Figure 5-2.** Representative LC-QqQMS chromatograms of selected antidepressants detected in primary-treated effluent sample extract.

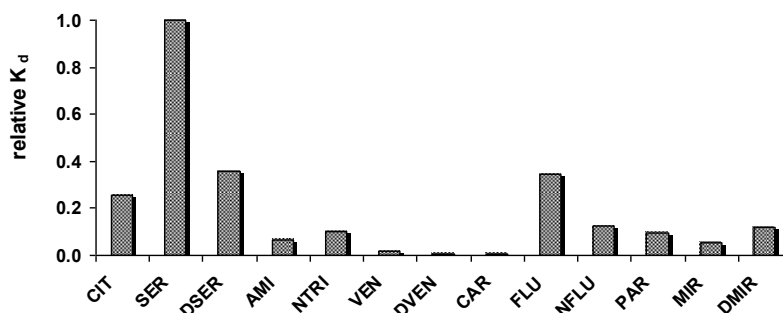
### 5.3.2. Antidepressants in sewage sludge

Primary sludge samples consistently displayed quantifiable amounts of the studied compounds (excepted FLUVO and DFLUVO) (**Tableau 5-2**). Highest mean concentrations in biosolid samples were found for VEN (227 ng g<sup>-1</sup>), CIT (172 ng g<sup>-1</sup>), DVEN (70 ng g<sup>-1</sup>), amitriptyline – AMI (58 ng g<sup>-1</sup>), and sertraline – SER (43 ng g<sup>-1</sup>). Our results are consistent with the mean concentrations for the antidepressants FLU (123 ng g<sup>-1</sup>) and PAR (41 ng g<sup>-1</sup>) reported by Radjenović et al. (2009) in primary sludge samples. Interestingly, among



reported concentrations, less antidepressant metabolites were detected in sewage sludge samples for *N*-desmethyl metabolites in comparison to their respective parent molecule. These findings suggest that more polar compounds have a lower affinity for the solid phase of sewage sludge and hence have limited removal rate.

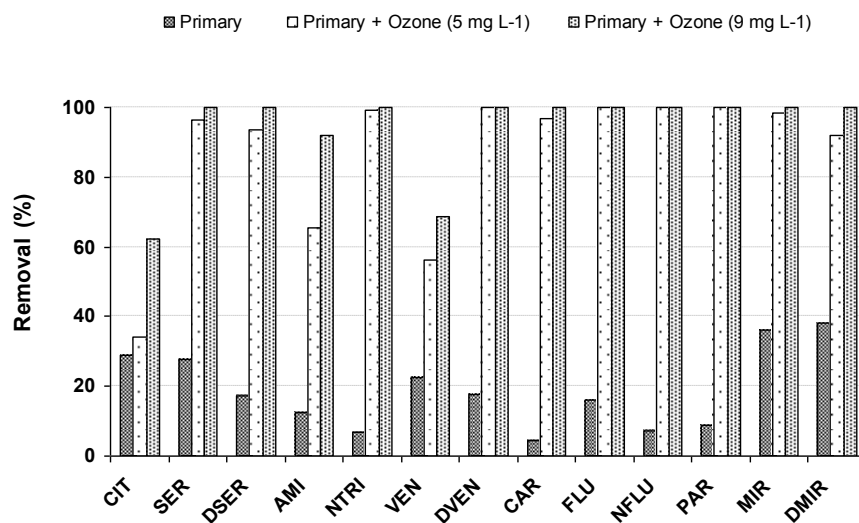
In order to describe the fate and behaviour of antidepressants in primary STP, specific sorption coefficient ( $K_d$ ) values for antidepressants and metabolites to sewage sludge were estimated. The  $K_d$  coefficients were calculated by assuming the ratio  $[\text{Sludge}] / [\text{Effluent}]$ ; where  $[\text{Sludge}]$  is the concentration of antidepressants in sewage sludge ( $\text{ng kg}^{-1}$ ) and  $[\text{Effluent}]$  is the concentrations of antidepressants in final effluent ( $\text{ng L}^{-1}$ ) (Deegan et al., 2011). The obtained  $K_d$  values were applied to evaluate the affinity of compounds to the primary STP sludge. The  $K_d$  values were lowest for VEN, DVEN, and CAR (Table 5-2) with values ranging from 21 to 72  $\text{L kg}^{-1}$ . With  $\log K_d$  values  $\leq 2$ , sorption to solid matter for VEN, DVEN, and CAR is therefore defined as less important (Deegan et al., 2011). Higher sorption behaviour is expected for SER, DSER, FLU, and CIT which have higher relative  $K_d$  values (Figure 5-3).



**Figure 5-3.** Relative  $K_d$  values of the studied compounds.

### 5.3.3. Antidepressants in treated effluent - Ozonation

Ozonation of the primary-treated effluent did degrade antidepressants with higher efficiency, yielding a mean removal efficiency of 88% when 5 mg L<sup>-1</sup> of ozone was applied (**Tableau 5-3**). Ten (10) of the 13 compounds initially present in the effluent had removal efficiencies  $\geq 92\%$  (**Figure 5-4**). Only three substances (CIT, AMI, and VEN) yielded lower removal efficiencies, being 34, 66, and 56% respectively. As discussed in introduction section, the ozonation mechanism is directly affected by the ozone stability. Thus, scavengers compounds (e.g. carbonate, bicarbonate, dissolved organic and humic acids) present in effluent may have slowed down the ozone decomposition by inhibiting the free-radical reaction chain, and consequently the formation of hydroxyl radicals OH• necessary to degrade saturated aliphatic carbon chain on molecules (Langlais, Reckhow et Brink, 1991). Since, CIT, AMI and VEN showed long tertiary amine aliphatic chains on their chemical structures, steric hindrance may have prevented ozone reactions normally expected at specific sites of the molecules (Trimm, 1980). In present study, it is very difficult to assess the relative importance of direct ozone-mediated transformations, and thereby to draw a general conclusion about each compound and transformation during ozonation in a single matrix with varying OH• scavenging capacities, under a certain pH condition. Obviously, the work presented therein was not intended to the understanding of ozonation mechanisms. Nevertheless, removal efficiency increased to 94% for most compounds using an optimal ozone dose of 9 mg L<sup>-1</sup> (**Figure 5-4**). At the highest ozone treatment tested (i.e. 13 mg L<sup>-1</sup>), all antidepressants were totally oxidized and degraded from primary-treated effluent samples. Snyder et al. (2006) have reported very similar removal rates for CAR (> 99%) and FLU (> 93%) for comparable effluent samples treated with 3.6 mg L<sup>-1</sup> of O<sub>3</sub>. Under controlled conditions using a 5-L glass jacketed reactor, Rosal et al. (2010) observed high removal efficiencies for CAR (98%), CIT (93%), FLU (100%), and VEN (88%) in wastewater samples exposed to 2.4 - 6.1 mg L<sup>-1</sup> of O<sub>3</sub> for less than 5 min.



**Figure 5-4.** Reduction of antidepressants and CAR in primary-treated effluent by ozone disinfection at 5 and 9 mg L<sup>-1</sup>.

**Tableau 5-3.** Mean concentrations and removal of antidepressants contained in final effluent following ozonation.

Compounds	Concentrations (n=2), Ozone 5 mg L <sup>-1</sup>			Concentrations (n=2), Ozone 9 mg L <sup>-1</sup>		
	Effluent (ng L <sup>-1</sup> )	Disinfected effluent (ng L <sup>-1</sup> )	Removal Eff. (%)	Effluent (ng L <sup>-1</sup> )	Disinfected effluent (ng L <sup>-1</sup> )	Removal Eff. (%)
CIT	186 ± 27	123 ± 11	34	148 ± 16	56 ± 1	62
SER	14 ± 2	---	100	9.4 ± 0.1	---	100
DSER	23 ± 1	---	100	19 ± 3	---	100
AMI	106 ± 5	36 ± 1	66	195 ± 11	15 ± 1	92
NTRI	18 ± 1	0.18 ± 0.01	99	19 ± 4	---	100
VEN	2194 ± 191	963 ± 43	56	3144 ± 107	986 ± 27	69
DVEN	2319 ± 11	---	100	3448 ± 279	---	100
CAR	716 ± 4	12 ± 1	98	714 ± 13	---	100
FLU	6.3 ± 0.8	---	100	9.5 ± 0.6	---	100
NFLU	11 ± 2	---	100	6.5 ± 0.2	---	100
PAR	9.0 ± 1.3	---	100	13 ± 4	---	100
MIR	104 ± 1	1.6 ± 0.1	98	109 ± 3	---	100
DMIR	41 ± 4.1	3.3 ± 0.4	92	25 ± 1	---	100

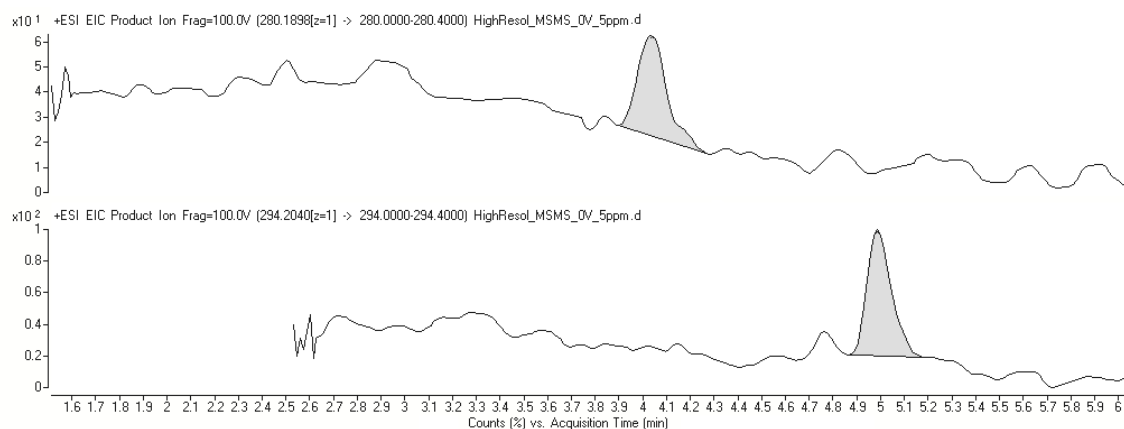
#### 5.3.4. Characterization of new by-products by LC-QqToFMS

In this study, the two most abundant antidepressants detected in raw sewage were VEN and its desmethyl metabolite DVEN. Therefore, primary-treated effluent samples previously treated with O<sub>3</sub> at different concentrations were screened by LC-QqToFMS to confirm the presence of related by-products of these two compounds.

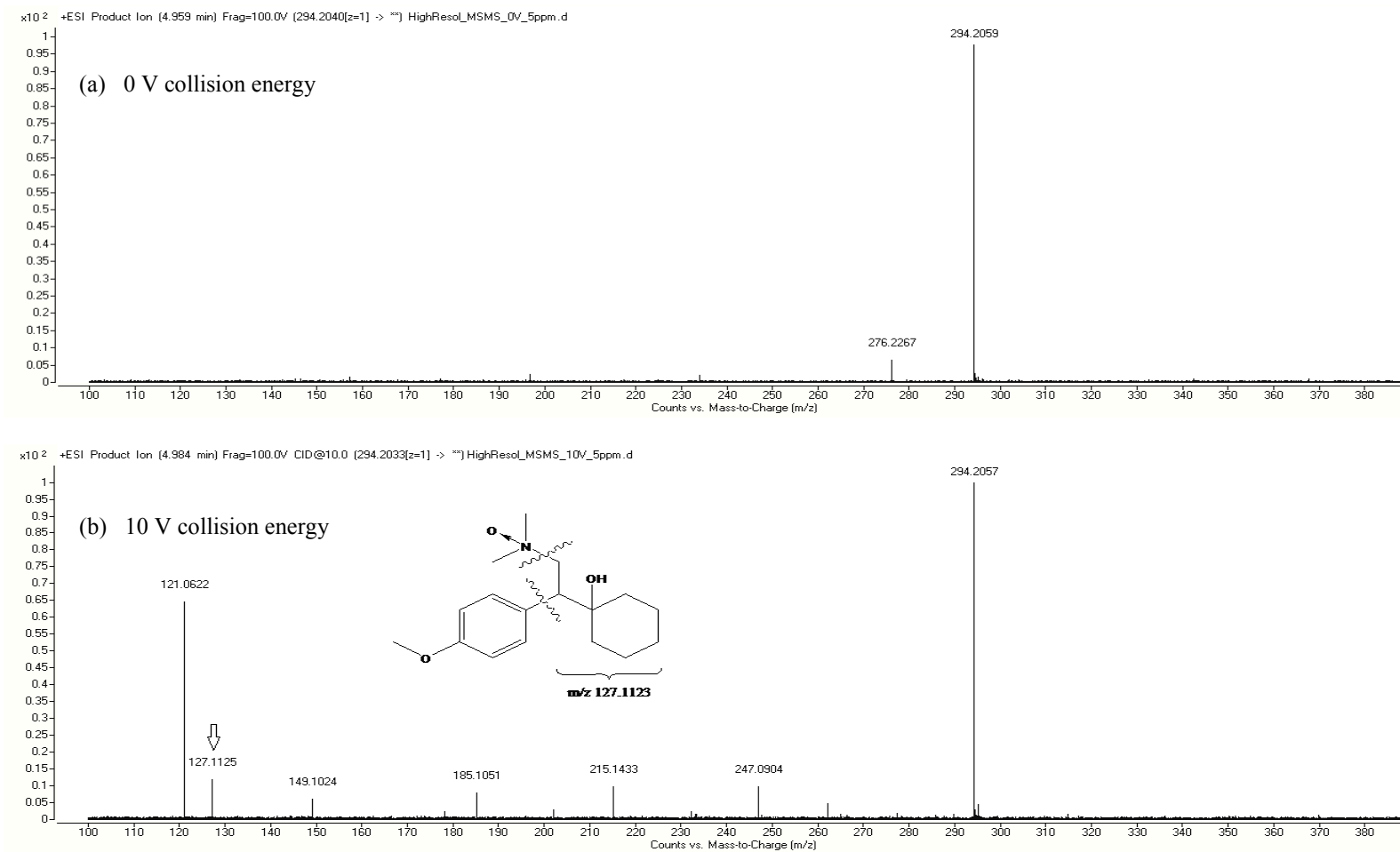
Initial tests performed on treated effluent extracts (O<sub>3</sub> dose: 5 mg L<sup>-1</sup>) in high resolution tandem MS mode using a mass range of  $m/z$  100-400 (specific collision energy: 0 V) enabled the positive detection of *N*-oxide by-product precursor ions for VEN ( $m/z$  294.2059, accurate mass error: -3.40 ppm) and DVEN ( $m/z$  280.1903, accurate mass error: -3.21 ppm). The chromatograms and mass spectrums of both characterized by-products are depicted respectively in **Figures 5-5**, **5-6a**, and **5-7a**. Precursor  $[M + H]^+$  ions were isolated in the quadrupole of the QqToF and then fragmented in the collision cell at 10 V in order to perform accurate mass measurements on the resulting fragment ions. Isolation and fragmentation of the precursor ion of *N*-oxide VEN ( $m/z$  294.2057, accurate mass error: -4.08 ppm) generated a product ion at  $m/z$  127.1125 (**Figure 5-6b**). This ion fragment corresponds to  $[C_8H_{14}O + H]^+$  and has an accurate mass error from theoretical values of 1.57 ppm. As for the *N*-oxide DVEN when its precursor ion at  $m/z$  280.1910 (accurate mass error: -0.71 ppm) was isolated and fragmented, an ion at  $m/z$  113.0966 was observed that could be interpreted as  $[C_7H_{12}O + H]^+$  with an accurate mass error of  $\pm 0.00$  ppm (**Figure 5-7b**). During MS/MS characterization, it was decided to keep a large isolation width of the quadrupole (e.g. 4  $m/z$ ) to increase sensitivity. Hence, MS/MS mass spectra of *N*-oxide VEN and DVEN likely contained product ions of other molecules that may have interfered with the mass spectrum interpretation. According to European Commission Decision 2002/657/EC (Commission of the European Communities, 2002), at least 4 “identification” points are required in order to confirm the presence of a substance. Since one high-resolution precursor ion and one high-resolution product ion were obtained during experiments (total identification points: 2 + 2.5 = 4.5), the results of our study (with

accurate mass errors  $< \pm 5.00$  ppm) were considered sufficient to confirm the presence of the new *N*-oxide by-products.

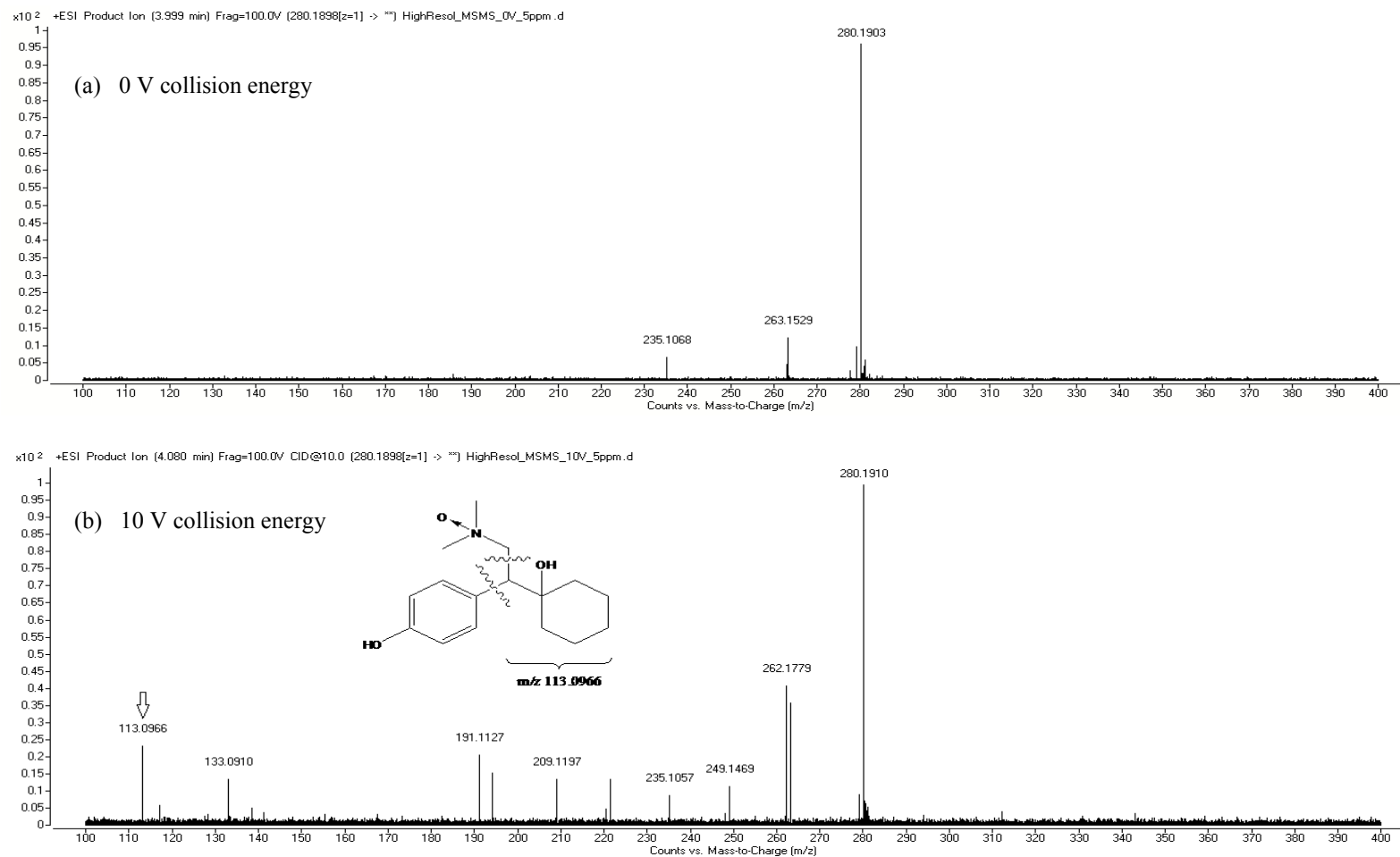
Additional LC-QqToFMS analysis performed on effluent extracts previously treated with  $9 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{O}_3$  confirmed also the presence of both *N*-oxide by-products. When the concentration of  $\text{O}_3$  reached  $13 \text{ mg L}^{-1}$ , none of the by-products were detected in corresponding effluent samples. This suggests that the higher  $\text{O}_3$  dosage would be required to completely degrade the *N*-oxide by-products from treated effluents. Additional tests performed on raw sewage (influent) and primary-treated effluent confirmed the absence of the two *N*-oxide by-products prior treatments. To our knowledge, the present study is the first one to report the characterization of antidepressant by-products in municipal effluent samples after ozone treatment.



**Figure 5-5.** LC-QqToFMS chromatograms of *N*-oxide by-products detected in disinfected effluent ( $\text{O}_3$ ,  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ).



**Figure 5-6.** LC-QqToFMS mass spectra of *N*-oxide VEN in disinfected effluent ( $\text{O}_3$ ,  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ): product ions at 0 V collision energy (a) and 10 V collision energy (b).



**Figure 5-7.** LC-QqToFMS mass spectra of *N*-oxide DVEN in disinfected effluent (O<sub>3</sub>, 5 mg L<sup>-1</sup>): product ions at 0 V collision energy (a) and 10 V collision energy (b).



#### **5.4. Conclusion**

This study described the fate and behaviour of antidepressants and their *N*-desmethyl metabolites in a primary STP following ozone treatment. Effluent ozonation led to higher mean removal efficiencies than current primary treatment, and therefore represented a promising strategy for the elimination of antidepressants in urban wastewaters. However, the use of O<sub>3</sub> produced *N*-oxide by-products with unknown toxicity. Of particular concern is the potential that removal of pharmaceuticals following wastewater disinfection using advanced oxidation such as ozone could generate by-products that would need to be identified, quantified and evaluated for their toxicity.

#### **5.5. Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the city of Repentigny for providing sewage and biosolid samples. This work was funded by the Chemical Management Plan – Health Canada and the St. Lawrence Action Plan.

## **Supplementary material**

**Tableau 5-4.** Optimized LC-(ESI+) QqQ conditions for the analysis of antidepressants (Gagnon et al., 2012).

Compounds	$t_R$ (min)	SRM transitions (m/z)	Fragmentor (V)	Collision Energy (V)
Carbamazepine (CAR)	6.62	237.1 → 194.0, 165.0	110	17, 50
10,11-Dihydrocarbamazepine (DHC)	6.69	239.3 → 194.0	120	21
Desmethylvenlafaxine (DVEN)	6.98	264.2 → 246.1, 107.1	105	9, 41
Desmethyilmirtazepine (DMIR)	7.89	252.3 → 195.1, 209.1	110	21, 21
Cis-Tramadol <sup>13</sup> -d <sub>3</sub> (TRA)	8.03	268.1 → 250.2	80	8
Mirtazepine (MIR)	8.09	266.4 → 195.0, 209.0	115	21
Bupropion-d <sub>9</sub> (BUP)	8.42	249.2 → 185.0	95	9
Desmethylfluvoxamine (DFLUVO)	8.55	305.3 → 229.0, 173.0	90	5, 50
Venlafaxine (VEN)	9.05	278.2 → 260.1, 121.1	95	9, 29
Fluvoxamine (FLUVO)	9.47	319.3 → 200.0, 226.0	95	21, 9
Citalopram (CIT)	9.51	325.2 → 109.1, 262.1	115	25, 17
Desmethylsertraline (DSER)	10.16	275.1 → 158.9, 123.0	95	21, 50
Paroxetine (PAR)	10.25	330.2 → 192.0, 135.0	125	21, 45
Norfluoxetine (NFLU)	10.78	296.1 → 134.2	75	5
Sertraline (SER)	11.44	306.1 → 158.9, 123.0	80	29, 50
Fluoxetine (FLU)	12.18	310.1 → 148.1	90	5
Amitriptyline (AMI)	12.27	278.2 → 105.1, 117.1	115	21, 21
Nortriptyline (NTRI)	13.24	264.2 → 105.1, 233.1	100	21, 13

## **Chapitre 6: Conclusion**

---

## 6.1. Contributions scientifiques

Tel que mentionné dans l'Introduction générale (**Chapitre 1**), la dépression majeure deviendra d'ici 2020 l'une des principales maladies invalidantes dans les pays industrialisés (Patten et Juby, 2008; Conseil du médicament, 2011). Paradoxalement, les nombreux progrès réalisés en psychiatrie permettent maintenant de meilleurs traitements pour les patients souffrant de dépression et d'épuisement professionnel. De toute évidence, les prescriptions d'antidépresseurs ne sont pas étrangères au succès des interventions menées par les médecins en milieu hospitalier. Néanmoins, malgré leur efficacité prouvée en thérapie, les antidépresseurs détectés dans l'environnement suscitent actuellement de sérieuses inquiétudes auprès de la communauté scientifique pour le biote aquatique.

Initialement, la présence d'antidépresseurs à l'état de traces (i.e. ordre du  $\text{ng L}^{-1}$ ) dans des matrices environnementales complexes a poussé nos travaux de recherche vers le développement de nouvelles méthodes analytiques LC-MS/MS performantes. Entre autres, l'amélioration de la composition de la phase mobile et la purification des extraits avec cartouches échangeuses de cations a permis d'augmenter de façon significative le seuil de détection de certains antidépresseurs présents dans les eaux usées non traitées de la station d'épuration de la ville de Montréal (**Chapitre 2**). L'application subséquente de cette nouvelle méthode analytique sur les effluents de Montréal a permis de démontrer la capacité limitée qu'avait cette station d'épuration à enlever les antidépresseurs à partir de son traitement primaire physico-chimique. Enfin, cette même méthode alliant spécificité et sensibilité a prouvé une fois de plus son efficacité lors d'analyses d'antidépresseurs dilués dans les eaux de surface diluées du Fleuve St-Laurent à 0.5 km du point rejet de la station (**Chapitre 2**).

Puisque le potentiel de bioaccumulation d'antidépresseurs a été démontrée chez certains organismes aquatiques (Brooks et al., 2005; Ramirez et al., 2007), des efforts ont

été déployés en laboratoire pour développer un nouveau protocole d'extraction permettant l'analyse sensible de résidus antidépresseurs dans différents tissus biologiques de poissons et de moules d'eau douce (**Chapitre 3**). L'exposition contrôlée de spécimens de truites juvéniles à différentes concentrations d'effluents après traitement primaire a permis de confirmer la distribution majoritaire d'antidépresseurs dans le foie et le cerveau des poissons. Par contre, d'autres spécimens exposés à des effluents traités avec ozone (15 mg L<sup>-1</sup>) ont démontré moins d'antidépresseurs bioaccumulés dans les mêmes tissus étudiés.

Jusqu'à présent, les données de toxicité disponibles pour les antidépresseurs faisaient intervenir surtout des valeurs de toxicité aiguë (LD<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>) ou chronique (NOEC, LOEC) où les organismes aquatiques étaient soit morts/vivant, inhibés ou affectés dans l'une de leurs fonctions biologiques (**Chapitre 1**). Pour une première fois dans la littérature, un test biochimique permettant la détection d'effets écotoxicologiques précoces suivant une exposition aux antidépresseurs a été rapporté dans un article scientifique. Ainsi, une corrélation a pu être établie entre les concentrations d'antidépresseurs dans le cerveau de poisson et l'activité d'un biomarqueur d'exposition (i.e. pompe N/K ATPase impliquée dans la régulation de la sérotonine) mesurée sur des synaptosomes de poissons préalablement exposés aux effluents municipaux (**Chapitre 3**).

Afin de mieux comprendre le devenir environnemental des antidépresseurs lors du traitement des eaux usées, des campagnes d'échantillonnage ont été complétées dans 5 stations d'épuration canadiennes opérant différents modes de désinfection. Des résultats cumulés à partir d'extraits d'affluent et d'effluent ont révélé de meilleurs taux d'enlèvement lorsque des traitements secondaires biologiques étaient opérés au lieu de primaires physico-chimiques (**Chapitre 4**). L'efficacité limitée obtenue avec les traitements primaires a prouvé que des mécanismes autres que ceux d'absorption à la matière particulaire étaient impliqués dans l'enlèvement des antidépresseurs (**Chapitre 4**). Cette étude a permis également de mettre en lumière l'importance de la configuration des stations

d'épuration, du temps de rétention des solides (SRT), du temps hydraulique de rétention (HRT) et de la température de l'effluent dans l'efficacité des traitements comparés. Le calcul de nombreuses valeurs de coefficients de sorption ( $K_d$ ) pour les boues de traitement primaire et secondaire a permis de prédire l'affinité que pourraient avoir certains antidépresseurs pour les phases particulières (**Chapitre 4**).

La décision d'incorporer l'antiépileptique carbamazépine parmi les antidépresseurs a permis de confirmer sa grande stabilité dans les eaux usées municipales. Étonnamment, cette drogue de plus en plus prescrite en thérapie avec les antidépresseurs, a été détectée à plusieurs occasions à des concentrations avoisinant les  $\mu\text{g L}^{-1}$  (**Chapitre 4 et 5**). Tel que suggéré par certains chercheurs (Clara, Strenn et Kreuzinger, 2004), la carbamazépine de par sa fréquente détection et sa persistance en milieu aquatique, pourrait devenir un excellent marqueur anthropogénique lors de futures études environnementales.

Les taux mitigés d'enlèvement d'antidépresseurs obtenus avec plusieurs traitements biologiques secondaires (30%) ont poussés nos expérimentations vers des traitements avancés. Le projet pilote avec traitement à l'ozone mis en place à la station d'épuration de la ville de Repentigny a démontré une efficacité remarquable pour l'enlèvement des antidépresseurs (**Chapitre 5**). En effet, une dose minimale d'ozone de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  a procuré un taux d'enlèvement moyen de 88% pour l'ensemble des substances étudiées. Toutefois, en dépit des résultats encourageants obtenus, la formation potentielle de sous-produits de transformation a soulevé des inquiétudes environnementales et surtout un intérêt pour un développement analytique permettant d'en identifier. La détection et caractérisation de nouveaux sous-produits *N*-oxyde (venlafaxine, desméthylvenlafaxine) par spectrométrie de masse à haute résolution (LC-QqToFMS) dans l'effluent traité à l'ozone a soulevé la possibilité de formation de multiples composés polaires dont la toxicité demeure jusqu'ici inconnue (**Chapitre 5**).

## 6.2. Défis, perspectives d'avenir

Les défis pour l'avenir sont nombreux. L'avancement du niveau de connaissance en ce qui a trait au devenir des antidépresseurs passe nécessairement par l'amélioration et le perfectionnement des méthodes analytiques existantes. Étant donné la complexité démontrée des nombreuses matrices environnementales, la spectrométrie de masse en tandem demeure sans contredit l'outil de travail par excellence pour suivre l'évolution des résidus antidépresseurs dans l'environnement. Avec les technologies actuellement disponibles, les chimistes analystes repoussent chaque jour le seuil de détection de ces contaminants à des concentrations jugées auparavant inaccessibles. D'ailleurs, ces limites de détection se rapprochant de plus en plus du *femto* gramme ( $10^{-12}$  g) sont-elles vraiment justifiées? Le peu de connaissance concernant la réelle toxicité des antidépresseurs dans l'environnement complique certainement l'analyse de risque environnemental ou « *Risk assessment* ». En ce sens, davantage de tests de toxicité sont requis afin de pallier un manque d'information à ce sujet. Également, le développement de nouveaux biomarqueurs d'exposition fiables permettant la détection d'effets toxicologiques subtils pourrait s'avérer un atout. Même constat concernant le développement d'une nouvelle méthode analytique sensible permettant de détecter des traces d'antidépresseur dans l'eau potable.

Selon diverses solutions proposées, deux approches sont actuellement préconisées pour enrayer ou diminuer l'apport de résidus antidépresseurs dans les milieux urbains: le contrôle à la source et l'amélioration des traitements des eaux usées (Larsen et al., 2004). Dans la première solution, le contrôle à la source cherche à réduire la charge de contaminants provenant des eaux résidentielles et des centres hospitaliers en séparant l'urine et en traitant les rejets des hôpitaux avant qu'ils atteignent les systèmes d'égouts publics. Intéressante à première vue, cette solution impliquerait cependant des rénovations majeures des infrastructures résidentielles mises en place depuis plusieurs années. Concernant l'amélioration des traitements des eaux usées, nos travaux nous démontrent



effectivement que les traitements dits « traditionnels » ne permettent pas l'enlèvement complet des antidépresseurs dans les eaux brutes des stations d'épuration. De ce fait, une combinaison de traitements avancés impliquant par exemple l'ajout de charbon activé (Grassi et al., 2012) ou d'ozone (Snyder et al., 2006) en concentration suffisante pour permettre une minéralisation complète pourrait représenter de prometteuses avenues à explorer. Néanmoins, le nombre toujours croissant de dépressions, les coûts annuels élevés des traitements de désinfection et les effets causés aux organismes aquatiques nous pousseront-ils bientôt vers une profonde réflexion quant à notre manière de vivre? À l'ère où la pharmacologie devient panacée à tous nos maux quotidiens, sommes-nous allés trop loin avec nos idéaux de performance? La question demeure entière, les déversements d'antidépresseurs dans les eaux réceptrices quant à eux pour l'instant se poursuivent...

## Bibliographie

- Aboulfadl K., De Potter C., Prévost M. et Sauvé S. 2010. Time-dependent integrity during storage of natural surface water samples for the trace analysis of pharmaceutical products, feminizing hormones and pesticides. *Chem. Centr. J.* 4: 10: 1-8.
- Barclay V.K.H., Tyrefors N.L., Johansson I.M. et Pettersson C.E. 2012. Trace analysis of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. Part II: Enantioselective quantification and studies of matrix effects in raw and treated wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1227: 105-114.
- Barron L., Tobin J. et Paull B. 2008. Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Environ. Monit.* 10: 353-361.
- Benotti M., Stanford B., Wert E. et Snyder S. 2009. Evaluation of a photocatalytic reactor membrane pilot system for the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from water. *Water Res.* 43: 1513-1522.
- Bergersen O., Hanssen K.Ø. et Vasskog T. 2012. Anaerobic treatment of sewage sludge containing selective serotonin reuptake inhibitors. *Bioresource Technol.* 117: 325-332.
- Bourin M. 1983. Biochimie de la dépression et ses conséquences pratiques. Dans: *Les antidépresseurs* (Édition Marketing, Éditeur des préparations Grandes Écoles-Médecine). Paris, France: Imprimerie Aubin, pp. 20-34.

- Bowen P.D. 2009. Use of selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of depression in older adults: Identifying and managing potential risk for hyponatremia. *Geriatr. Nurs.* 30(2): 85-89.
- Boxall A.B.A. 2004. The environmental side effects of medication. *European Molecular Biology Organization* 5(12): 1110-1116.
- Breslin F.C., Gnam W., Franche R.-L., Mustard C. et Lin E. 2006. Depression and activity limitations: examining gender differences in the general population. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology* 41(4): 648-655.
- Brooks B.W., Chambliss C.K., Stanley J.K., Ramirez A., Banks K.E., Johnson R.D. et Lewis R.J. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(2): 464-469.
- Buchburger W.W. 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Anal. Chim. Acta* 593: 129-139.
- Cahill J.D., Furlong E.T., Burkhardt M.R., Kolpin D. et Anderson L.G. 2004. Determination of pharmaceutical compounds in surface-and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1041: 171-180.
- Calisto V. et Esteves V.I. 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77: 1257-1274.
- Carballa M., Omil F., Ternes T. et Lema J.M. 2007. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 41: 2139-2150.

- Carlsson C., Johansson A.K., Alvan G., Bergman K. et Kuhler T. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutant? Part I: environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* 364: 67-87.
- Chavanne M., Beaudoin G.J., Jullien A. et Flamand E. 1986. *Chimie organique expérimentale*. Modulo éditeur. Montréal, Québec, Canada, pp. 271-326.
- Chenxi W., Spongberg A.L. et Witter J.D. 2008. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 73: 511-518.
- Cheung A. et Dewa C. 2006. Canadian community health survey: major depressive disorder and suicidality in adolescents. *Healthcare Policy* 2 (2): 76-89.
- Chiou C.T., Peters L.J. et Freed V.H. 1979. A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds. *Science* 206: 831-832.
- Chu S. et Metcalfe C.D. 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1163: 112-118.
- Clara M, Strenn B. et Kreuzinger N. 2004. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigation on the behaviour of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* 38: 947-954.

- Coetsier C.M., Spinelli S., Lin L., Roig B. et Touraud E. 2009. Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? *Environ. Int.* 35: 787-92.
- Commission of the European Communities. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Commun* L221 / 8 (2002), pp. 1-29.
- Conseil du médicament. 2011. Portrait de l'usage des antidépresseurs chez les adultes assurés par le régime public d'assurance médicaments du Québec. Gouvernement du Québec, janvier 2011. Bibliothèque et archives Nationales du Québec.
- Crifasil J.A., Le N.X. et Long C. 1997. Simultaneous identification and quantitation of fluoxetine and its metabolite, norfluoxetine, in biological samples by GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* 21: 415-419.
- Cunningham V.L., Buzby M., Hutchinson T., Mastrocco F., Parke N. et Roden N. 2006. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. *Environ. Sci., Technol.* 40: 3456-3462.
- Daughton C.G. et Ternes T.A. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107 (suppl. 6): 907-938.
- Debska J., Kot-Wasik A. et Namieśnik J. 2004. Fate and analysis of pharmaceutical residues in the aquatic environment. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34: 51-67.

- Deegan A.M., Shaik B., Nolan K., Urell K., Oelgemöller M., Tobin J. et Morrissey A. 2011. Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 8: 649-666.
- Delle Site A. 2001. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent / water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 30: 213-216.
- Demeestere K., Petrović M., Gros M., Dewulf J., Van Langenhove H. et Barceló D. 2010. Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 825-837.
- de Hoffmann E. et Stroobant V. 2005. Spectrométrie de masse. Dunod éditeur, 3<sup>ième</sup> édition, Sciences Sup, Paris, France, 425 p.
- De Vane C.L. 1999. Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19(4): 443-466.
- Dodd M.C., Rentsch D., Singer H.P., Kohler H.-P. E. et von Gunten U. 2010. Transformation of  $\beta$ -Lactam antibacterial agents during aqueous ozonation: reaction pathways and quantitative bioassay of biologically-active oxidation products. *Environ. Sci. Technol.* 44: 5940-5948.
- DSM III – Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux. 1980. Publié par l'Association américaine de psychiatrie, 494 p.

- Eap C.B. et Baumann P. 1996. Analytical methods for the quantitative determination of selective serotonin reuptake inhibitors for therapeutic drug monitoring purposes in patients. *J. Chromatogr. B Biomed. appl.* 686(1): 51-63.
- Elmghari-Tabib M., Laplanche A., Venien F. et Martin G. 1982a. Ozonation of amines in aqueous solutions. *Water Res.* 16: 223-229.
- Elmghari-Tabib M., Dalouche A., Faujour C., Venien E., Martin G. et Legeron J.P. 1982b. Ozonation reaction patterns of alcohols and aliphatic amines. *Ozone Sci. Eng.* 4: 195-205.
- Englert B. 2007. Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), EPA-821-R-08-002, pp. 1-72.
- Fent K., Weston A.A. et Carminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76: 122-159.
- Fong P.P. 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol. Bull.* 194: 143-149.
- Fong P.P. 2001. Antidepressants in aquatic organisms: A wide range of effects. Dans: *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Scientific and regulatory issues*. Daughton C.G. et Jones-Lepp éditeurs. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington D.C., États-Unis, pp.264-281.
- Fuller R.W., Hemrick-Luecke S.K., Litterfield E.S. et Audia J.E. 1995. Comparison of desmethylsertraline with sertraline as a monoamine uptake inhibitor *in vivo*. *Life Sci.* 19 : 135-149.

- Gagné F. et Blaise C. 2003. Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Comp. Biochem. Physiol. C 136: 117-125.
- Gagné F. et Blaise C. 2004. Effects of pharmaceuticals on aquatic biota – a review. Current Topics in Toxicology 1: 73–86.
- Gagné F., Fournier M. et Blaise C. 2004. Serotonergic effects of municipal effluents: induced spawning activity in freshwater mussels. Fresenius Environ. Bull. 13: 1099-1103.
- Gagné F., Blaise C., Fournier M. et Hansen P.D. 2006. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. Comp. Biochem. Physiol. C 143: 179-86.
- Gagnon C., Lajeunesse A., Čejka P., Gagné F. et Hausler R. 2008. Degradation of selected acidic and neutral pharmaceutical products in a primary-treated wastewater by disinfection processes. Ozone Sci. Eng. 30: 387–392.
- Göbel A., Thomsen A., McArdeall C.S., Alder A.C., Giger W., Theiß N., Löffler D. et Ternes T.A. 2005. Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge. J. Chromatogr. A 1085: 179-189.
- Gómez M.J., Petrović M., Fernández-Alba A.R. et Barceló D. 2006. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. J. Chromatogr. A 1114: 224-233.
- Gorman J.M. 2009. Mirtazepine: clinical review. J. Clin. Psychiatry 60 (suppl. 17): 9-13.



- Grassi M., Kaykioglu G., Belgiorno V. et Lofrano G. 2012. Removal of emerging contaminants from water and wastewater by adsorption process. Dans: Emerging compounds removal from wastewater – Natural and solar based treatments. Lofrano G. éditeur. Springer briefs in molecular science green chemistry for sustainability, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, pp. 15-37.
- Gros M., Petrović M. et Barceló D. 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70: 678-690.
- Gross J.H. 2004. Mass spectrometry – A textbook. Springer-Verlag Heidelberg éditeur, Heidelberg, Germany, 518 p.
- Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C. et Jørgensen S.E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A review. *Chemosphere* 36(2): 357-393.
- Hayashi Y., Matsuda R., Ito K., Nishimura W., Imali K. et Maeda M. 2005. Detection limit estimated from slope of calibration curve: an application to competitive ELISA. *Anal. Sci.* 21: 167-169.
- Health Canada. 2002. Rapport: A rapport on mental illnesses in Canada. Publié par: Health Canada Editorial board mental illnesses in Canada, Ottawa, Canada. pp. 7-108.
- Hébert N., Gagné F., Čejka P., Bouchard B., Haussler R., Cyr D.G., Blaise C. et Fournier M. 2008. Effects of ozone, ultraviolet and peracetic acid disinfection of a primary-treated municipal effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 148: 122–127.

- Heberer T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131: 5-17.
- Henry T.B., Kwon J.W., Armbrust K.L. et Black M.C. 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2229-2233.
- Henry T.B. et Black M.C. 2007. Mixture and single-substance acute toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 1751-1755.
- Himmelsbach M., Buchberger W. et Klampfl C.W. 2006. Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction. *Electrophoresis* 27: 1220-1226.
- Hiraoka K., Murata K. et Kudaka I. 1995. Do the electrospray mass spectra reflect the ion concentrations in sample solution? *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 43(3): 127-138.
- Hörsing M, Ledin A., Grabic R., Fick J., Tysklind M., la Cour Jansen J. et Andersen H.R. 2011. Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludge. *Water Res.* 45: 4470-4482.
- Huber M.M., Göbel A., Joss A., Hermann N., Löffler D., Mcardell C.S., Ried A., Siegrist H., Terne T.A. et Von Gunten U. 2005. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluent: A pilot study. *Environ Sci. Technol.* 39: 4290-4299.

- Huq S., Dixon A., Teuscher J., Lok S. et Kallury K. 2003. Application note TN-008: Efficient extraction of basic drugs from biological matrices using a polymeric cationic mixed-mode sorbent Strata<sup>TM</sup>X-C. Phenomenex Inc. (Torrance, CA, USA), pp. 1-2.
- IMS Health Canada. 2006. Antipsychotic / Estimated pill consumption in 2006. Canadian CompuScript, Montreal, Quebec, Canada.
- INSMT - Institut des neurosciences, de la santé mentale et des toxicomanies. 2012. Le cerveau à tous les niveaux! Disponible sur : [<http://lecerveau.mcgill.ca/avance.php>], dernier accès 2012/03/06.
- Jelić A., Petrović M. et Barceló, D. 2009. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography / quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta* 80: 363-371.
- Johnson D.J., Sanderson H., Brain R.A., Wilson C.J. et Solomon K.R. 2007. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67: 128-139.
- Jones O.A.H., Voulvoulis N. et Lester J.N. 2005. Human pharmaceuticals in wastewater treatment processes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 35: 401-427.
- Jones O.A.H., Voulvoulis N. et Lester, J.N. 2006. Partitioning behaviour of five pharmaceutical compounds to activated sludge and river sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 297-305.

- Jones-Lepp T.L. et Stevens R. 2007. Pharmaceuticals and personal care products in biosolids / sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1173-1183.
- Kakko I., Toimela T. et Tahti H. 2003. The synaptosomal membrane bound ATPase as target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Chemosphere* 51: 475-480.
- Kanoh N., Hori K., Ishigaki T. et Hori S. 1998. Effect on serotonin on ouabain-sensitive,  $K^+$ -dependent, p-nitrophenylphosphatase activity in strial marginal cells of normal and reserpinized guinea pigs. *Histochem J.* 30: 263-266.
- Kinney C.A., Furlong E.T., Zaugg S.D., Burkhardt M.R., Werner S.L., Cahill J.D. et Jorgensen G.R. 2006. Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environ. Sci. Technol.* 40: 7207-7215.
- Koe B.K., Weissman A., Welch W.M. et Browne R.G. 1983. Sertraline, 1S,4S-N-methyl-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine, a new uptake inhibitor with selectivity for serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226: 686-700.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B. et Buxton H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in the U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1202-1211.
- Kot-Wasik A., Debska J. et Namieśnik J. 2007. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *Trac-Trend Anal. Chem.* 26: 557-568.

- Kupfer D.J. 1999. Research in affective disorders comes of age. *J. Am. J. Psychiatry* 156: 165-167.
- Kwon J.W. et Armbrust K.L. 2008. Aqueous solubility, n-octanol-water partition coefficient, and sorption of five selective serotonin reuptake inhibitors to sediments and soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81: 128-135.
- Lajeunesse A. et Gagnon C. 2007. Determination of acidic pharmaceutical products and carbamazepine in roughly primary-treated wastewater by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 87(8): 565-578.
- Lajeunesse, A., Gagnon, C. et Sauvé, S., 2008. Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 80: 5325–5333.
- Lajeunesse A., Gagnon C., Gagné F., Louis S., Čejka P. et Sauvé S. 2011. Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects. *Chemosphere* 83: 564-571.
- Lajeunesse A., Smyth S.A., Barclay K., Sauvé S. et Gagnon C. 2012. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Res.* 46: 5600-5612.

- Lamas J.P., Salgado-Petinal C., García-Jares C., Llompарт M., Cela R. et Gómez M. 2004. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. *J. Chromatogr. A* 1046: 241-247.
- Langford K.H. et Thomas K.V. 2009. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environ. Int.* 35: 766-70.
- Langlais B., Reckhow D.A. et Brink D.R. 1991. Chapitre II: Fundamental aspects, Dans : Ozone in water treatment – Application and engineering, AWWA Research Association / Compagnie Générale des eaux, Langlais B., Reckhow D.A. et Brink D.R. éditeurs, Lewis publishers inc., Michigan, USA, pp. 11-79.
- Larsen T.A., Lienert J., Joss A. et Siegrist H. 2004. How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Biotechnol.* 113(1-3): 295-304.
- Lazzara R., Blázquez M., Porte C. et Barata C. 2012. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 106-107: 123-130.
- Lee H.-B., Peart T.E. et Svoboda M.L. 2005. Determination of endocrine-disrupting phenol, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1094: 122-129.
- Leonard B. et Spencer P. 1990. Antidepressant effects on adrenoceptor interactions in brain. Dans: Antidepressants: Thirty years on (CNS – Clinical Neuroscience Publisher). Londre, Royaumes-Unis : Whitstable Litho Printers Ltd., pp. 36-45.

- Lishman L., Smyth S.A., Sarafin K., Kleywegt S., Toito J., Peart T., Lee B., Servos M., Beland M. et Seto P. 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 367: 544-558.
- MacLeod S.L., Sudhir P. et Wong C.S. 2007. Stereoisomer analysis of wastewater-derived  $\beta$ -blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1170: 23-33.
- Mallet C.R., Lu Z. et Mazzeo J.R. 2004. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 49-58.
- Massaroti P., Cassiano N.M., Duarte L.F., Campos D.R., Marchioretto M.A., Bernasconi G., Calafatti S., Barros F.A.P., Meurer E.C. et Pedrazzoli J. 2005. Validation of a selective method for determination of paroxetine in human plasma by LC-MS/MS. *J. Pharm. Sci.* 8(2): 340-347.
- Maurer H.H. et Bickeboeller-Friedrich J. 2000. Screening procedure for detection of antidepressants of the selective serotonin reuptake inhibitor type and their metabolites in urine as part of a modified systematic toxicological analysis procedure using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 24: 340-347.
- McLafferty F.W. 1981. Tandem mass spectrometry. *Science* 16(214) : 280-287.

- Méndez-Arriaga F., Otsu T., Oyama T., Gimenez J., Esplugas S., Hidaka H. et Serpone N. 2011. Photooxidation of the antidepressant drug fluoxetine (Prozac<sup>®</sup>) in aqueous media by hybrid catalytic/ozonation processes. *Water Res.* 45: 2782-2794.
- Mennigen J.A., Sassine J., Trudeau V.L. et Moon T.W. 2010a. Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 100: 128-137.
- Mennigen J.A., Lado W.E., Zamora J.M., Duarte-Guterman P., Langlois V.S., Metcalfe C.D., Chang J.P., Moon T.W. et Trudeau V.L. 2010b. Waterborne fluoxetine disrupts the reproductive axis in sexually mature male goldfish, *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 100: 354-364.
- Metcalfe C.D., Koenig B.G., Bennie D.T., Servos M. et Struger J. 2003a. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2872-2880.
- Metcalfe C.D., Miao X.-S., Koenig B.G. et Struger J. 2003b. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(12): 2881-2889.
- Metcalfe C.D., Chu S., Judt C., Li H., Oakes K.D., Servos M.R. et Andrews D.M. 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure exposure in an urban watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 29(1): 79-89.
- Mills D.S. 2003. Medical paradigms for the study of problem behaviour: a critical review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81: 265-277.



- Montreal WWTP – La station d'épuration de la ville de Montréal. 2012. La station d'épuration Jean-R. Marcotte. Disponible sur : [[http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?\\_pageid=6497,54345571&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?_pageid=6497,54345571&_dad=portal&_schema=PORTAL)], dernier accès le 2012/05/11.
- Nakamura Y., Yamamoto H., Sekizawa J., Kondo T., Hirai N. et Tatarazako N. 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* 70: 865-873.
- Nalcz-Jawecki G. 2007. Evaluation of the *in vitro* biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. *Chemosphere* 70: 29-35.
- Nieto A., Borrull F., Pocurull E. et Marcé R.M. 2007. Pressurized liquid extraction of pharmaceuticals from sewage-sludge. *J. Sep. Sci.* 30: 979-984.
- Oller, I., Malato, S. et Sánchez-Pérez, J.A. 2011. Combination of advanced oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination – A review. *Sci. Total Environ.* 409: 4141-4166.
- Ort C., Lawrence M.G., Rieckermann J. et Joss A. 2010. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? – A critical review. *Environ. Sci. Technol.* 44: 6024-6035.
- Oulton R.L., Kohn T. et Cwiertny D.M. 2010. Pharmaceuticals and personal care products in effluent matrices: a survey of transformation and removal during wastewater treatment and implications for wastewater management. *J. Env. Monit.* 12: 1956-1978.

- Paterson, G. et Metcalfe C.D., 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 74: 125-130.
- Patten S. et Juby H. 2008. Profil de la dépression clinique au Canada – Réseau des centres de données de recherche (RDC) : N° 1, février 2008, 26 p.
- Paus E., Jonzier-Perey M., Cochard N., Eap C.B. et Baumann P. 2004. Chirality in the new generation of antidepressants: stereoselective analysis of the enantiomers of mirtazapine, *N*-demethylmirtazapine, and 8-hydroxymirtazapine by LC-MS. *Ther. Drug Monit.* 26(4): 366-374.
- Péry A.R.R., Gust M., Vollat B., Mons R., Ramil M., Fink G., Terne T. et Garric J. 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere* 73: 300-304.
- Radjenović J., Jelić A., Petrović M. et Barceló D. 2009. Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 1685-1695.
- Ramirez A.J., Mottaleb M.A., Brooks B.W. et Chambliss C.K. 2007. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79: 3155-3163.
- Rand G.M. 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment. 2<sup>ième</sup> édition, Taylor & Francis éditeur, Washington D.C., États-Unis.

- Reddy S., Iden C.R. et Brownawell B.J. 2005. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77: 7032-7038.
- Redshaw C.H., Wootton V.G. et Rowland S.J. 2008a. Uptake of the pharmaceutical Fluoxetine Hydrochloride from growth medium by *Brassicaceae*. *Phytochemistry* 69(13): 2510-2516.
- Redshaw C.H., Cooke M.P., Talbot H.M., McGrath S. et Rowland S.J. 2008b. Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *J. Soils Sediment* 8: 217-230.
- Richard D., Senon J.-L. et Tournier N. 2006. Les antidépresseurs. Dans : *Médicaments en psychiatrie* (Édition Lamarre). Paris, France : Imprimerie Euradius, pp. 55-85.
- Rodriguez N. et Renaud F.L. 1980. On the possible role of serotonin in the regulation of regeneration of cilia. *J. Cell. Biol.* 85: 242-247.
- Rosal R., Rodríguez A., Perdigón-Melón J.A., Petre A., García-Calvo E., Gómez M.J., Agüera A. et Fernández-Alba A.R. 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 44: 578-588.
- Rouessac F. et Rouessac A. 1995. *Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Masson édition, 2<sup>ième</sup> édition, Enseignement de la chimie, Paris, France, pp. 3-282.

- Rúa-Gómez P.C. et Püttmann W. 2012. Impact of wastewater treatment plant discharge of lidocaine, tramadol, venlafaxine and their metabolites on the quality of surface waters and groundwater. *J. Environ. Monit.* 14: 1391-1399.
- Sabljić A., Güsten H., Verhaar H. et Hermen J. 1995. QSAR modelling of soil sorption. Improvements and systematics of  $\log K_{oc}$  vs.  $\log K_{ow}$  correlations. *Chemosphere* 31: 4489-4514.
- Salgado-Petinal C., Lamas J.P., Garcia-Jares C., Llompart M. et Cela R. 2005. Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 1351-1359.
- Schultz M.M. et Furlong E.T. 2008. Trace analysis of antidepressant pharmaceuticals and their select degradates in aquatic matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Anal. Chem.* 80: 1756-1762.
- Schultz M.M., Furlong E.T., Kolpin D.W., Werner S.L., Schoenfuss H.L., Barber L.B., Blazer V.S., Norris D.O. et Vajda A.M. 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci., Technol.* 44: 1918-1925.
- Schultz M.M., Painter M.M., Bartell S.E., Logue A., Furlong E.T., Werner S.L., et Schoenfuss H.L. 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposure on male fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 104: 38-47.

- Segura P.A., Garcia-Ac A., Lajeunesse A., Ghosh D., Gagnon C. et Sauvé S. 2007. Determination of six anti-effectives in wastewater using tandem solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Environ. Monit.* 9: 307-313.
- Segura P.A. (2009). *Développement de techniques analytiques pour la détermination des agents anti-infectieux dans les eaux environnementales* (Thèse de doctorat). Université de Montréal, pp. 20-37.
- Servos M.R., Bennie D.T., Burnison B.K., Jurkovic A., McInnis R., Neheli T., Schnell A., Seto P., Smyth S.A. et Ternes T.A. 2005. Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 336: 155-170.
- Shon H.K., Vigneswaran S. et Snyder S.A. 2006. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater : constituents, effects, and treatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 36: 327-374.
- Smith E.M., Chu S., Paterson G., Metcalfe C.D. et Wilson J.Y. 2010. Cross-species comparison of fluoxetine metabolism with fish liver microsomes. *Chemosphere* 79: 26-32.
- Snyder S.A., Wert E.C., Rexing D.J., Zegers R.E. et Drury D.D. 2006. Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and wastewater. *Ozone Sci. Eng.* 28: 455-460.
- Snyder S.A. 2008. Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. *Ozone Sci. Eng.* 30: 65-69.

- Standard method 2350. Oxidant demand / Requirement. Approved by SM Committee: 2007, pp. 2-40 à 2-44.
- Stanley J.K., Ramirez A.J., Chambliss C.K. et Brooks B.W. 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 69: 9-16.
- Stephens T. et Joubert N. 2001. The economic burden of mental health problems in Canada. *Chronic Diseases in Canada* 22 (1): 18-23.
- Sui Q., Huang J., Deng S., Chen W. et Yu G. 2011. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in different biological wastewater treatment processes. *Env. Sci. Technol.* 45: 3341-3348.
- Sundin L., Nilsson G.E., Block M. et Lofman C.O. 1995. Control of gill filament blood flow by serotonin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol.* 268: 1224-1229.
- Svenningsson P., Chergui K., Rachleff I., Flajolet M., Zhang X., El Yacoubi M., Vaugeois J.-M., Nomikos G.G. et Greengard P. 2006. Alterations in 5-HT<sub>1B</sub> receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 311: 77-80.
- Tchobanoglous G., Burton F., Stensel H.D. 2004. Wastewater engineering: treatment and reuse. Metcalf & Eddy Ed., McGraw-Hill series in civil and environmental engineering, 4th edition, New-York, London, pp. 545-1026.
- Ternes T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage plants and rivers. *Water Res.* 32 (11): 3245-3260.

- Ternes T.A., Joss A et Siegrist H. 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38(20): 392A-399A.
- Ternes T.A., Bonerz M., Hermann N., Löffler D., Keller E., Lacida B.B. et Alder A. 2005. Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC / tandem MS and GC/MS. *J. Chromatogr. A* 1067: 213-223.
- Togola A. et Budzinski H. 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1177: 150-158.
- Tomiyasu H., Fukutomi H. et Gordon G. 1985. Kinetics and mechanism of ozone decomposition in basic aqueous solutions. *Inorg. Chem.* 24: 2962-2966.
- Tournier M., Greenfield B., Galbaud du Fort G., Ducruet T., Zito J.M., Cloutier A.-M. et Moride Y. 2010. Patterns of antidepressant use in Quebec children and adolescents: trends and predictors. *Psychiatry Research* 179: 57-63.
- Trimm D.L. 1980. Chapitre 4: The liquid phase oxidation of sulphur, nitrogen, and chlorine compounds, in *Comprehensive chemical kinetics – Vol. 16*. Dans: Liquid phase oxidation, Bamford C.H. et Tipper C.F.H. éditeurs, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Pays-Bas, pp. 205-249
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA) – Standard method 4500-03 B for ozone. Standard methods for the examination of water and wastewater, U.S. Environmental Protection Agency (EPA) – 21st Edition: 2005.
- Vanderford B.J., Pearson R.A., Rexing D.J. et Snyder S.A. 2003. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75: 6265-6274.

- van der Ven K., De Wit M., Keil D., Moens L., Van Leemput K., Naudts B. et De Coen W. 2005. Development and application of a brain-specific cDNA microarray for effect evaluation of neuro-active pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. B 141: 408-417.
- Van Rooyen G.F., Badenhorst D., Swart K.J., Hundt H.K.L., Scanes T. et Hundt A.F. 2002. Determination of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. J. Chromatogr. B 769: 1-7.
- Vasskog T., Berger U., Samuelsen P.-J., Kallenborn R. et Jensen E. 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. J. Chromatogr. A 1115: 187-195.
- Vasskog T., Andersen T., Pedersen-Bjergaard S., Kallenborn R. et Jensen E. 2008. Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. J. Chromatogr. A 1185: 194-205.
- Vasskog T., Bergersen O., Andersen T., Jensen E. et Eggen T. 2009. Depletion of selective serotonin reuptake inhibitors during sewage sludge composting. Waste Manage. 29: 2808-2815.
- Viglino L., Prévost M. et Sauvé, S., 2011. High throughput analysis of solid-bound endocrine disruptors by LDTD-MS/MS. J. Environ. Monit. 13: 583-590.
- Weigel S., Berger U., Jensen E., Kallenborn R., Thorensen H. et Hühnerfuss H. 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø / Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. Chemosphere 56: 583-592.



- Wells M.J.M. 2006. Log  $D_{ow}$ : key to understanding and regulating wastewater-derived contaminants. *Environ. Chem.* 3: 439-449.
- Wert E., Rosario-Ortiz F. et Snyder S. 2009. Effect of ozone exposure on the oxidation of trace organic contaminants in wastewater. *Water Res.* 43: 1005-1014.
- Wick A., Fink G., Joss A., Siegrist H. et Ternes T.A. 2009. Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Res.* 43: 1060-1074.
- Wille S.M., Maudens K.E., Van Peteghem C.H. et Lambert W.E. 2005. Development of a solid phase extraction for 13 “new” generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* 1998: 19-29.
- Wu C., Spongberg A.L., Witter J.D., Fang M. et Czajkowski K.P. 2010. Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environ. Sci. Technol.* 44: 6157-6161.
- Zhou S. et Cook D. 2000. Protonation in electrospray mass spectrometry: wrong-way-round or right-way-round? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11: 961-966.

